

Université Bordeaux Segalen

Année 2013

Thèse n° 2068

THÈSE
pour le
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Science, Technologie, Santé

Option : Génétique

Présentée et soutenue publiquement

Le 28 Novembre 2013

Par Hélène VIGNAUD

ÉTUDE DE LA TOXICITÉ DU PEPTIDE
AMYLOÏDE BETA $A\beta_{42}$ DANS LA LEVURE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Sous la direction du Pr. Christophe CULLIN

Membres du Jury :

M. François DOIGNON, professeur à l'Université Bordeaux 2

Mme. Naïma BELGAREH-TOUZÉ, Chargé de Recherche CNRS, Paris

M. Human REZAEI, Directeur de Recherche INRA, Paris

Mme Joëlle CHABRY, Directeur de Recherche INSERM, Nice

Mme Sophie LECOMTE, Directeur de Recherche CNRS, Bordeaux

M. Christophe CULLIN, professeur à l'Université Bordeaux 2

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Remerciements

Je voudrais adresser un grand merci

*à mes rapporteurs Naïma Belgareh-Touzé et Human Rezaei qui ont accepté d'accorder de leur temps à la lecture de mon manuscrit,
à Joëlle Chabry, Sophie Lecomte et François Doignon qui m'ont fait le plus grand plaisir en acceptant de participer à mon jury en tant qu'examineurs.*

à Christophe Cullin qui m'a toujours écoutée, soutenue, motivée et rassurée au cours de ma thèse, pour la confiance qu'il m'a accordée et qu'il m'accorde toujours, pour tout ce qu'il m'a appris, humainement et scientifiquement. Merci pour tout Christophe !

à toute l'équipe AFA, membres présents et passés. Christelle, merci pour ta gentillesse ton écoute et tes conseils, Claude, merci pour tous les bons moments scientifiques (ou pas) qu'on a partagé, Ioan merci pour vos anecdotes et conseils de biochimiste de l'Est. Marion, merci pour ton soutien et tes conseils, les feux de l'amour, les infos yahoo, mais aussi toutes les conversations plus sérieuses, scientifiques et non scientifiques, les bons moments et les moins marrants. Pas de l'équipe AFA mais presque, Sarah, merci pour ta bonne humeur et tous ces moments de franche rigolade ! Les étudiants qui sont passés par le labo, Elodie qui a abattu un travail monstrueux (bon courage pour la suite !), Julie (merci pour le tiramisu !), Maëlle, Maxence qui revient, Geoffray... Merci, on s'est quand même bien marré ! Mes prédécesseurs, Fabien et Myriam, merci infiniment !

à toutes les personnes avec qui j'ai collaboré et pu profiter de leur expérience, Anne Devin, Edgar Yoboue, Cécile Courrège et Nicolas Talarek. Et bien sûr Sophie Lecomte, merci pour tout !

à mes amis Nathalène, Romain, Simon, Virginie et Raj, on est tous dans le même bateau ! À Aurélie qui aurait bien méritée de l'être et Dorian qui a trouvé mieux ailleurs ! Elodie et Delphine, Audrey ma toute belle, merci merci ! Lo, Moon, Charlotte et Bruno, Sophie que je ne vois pas assez. Asen, tu t'es tout pris quand ça n'allait pas fort, merci de m'avoir supportée comme ça ! Et merci pour tout le reste aussi !

Enfin, à toute ma famille, Papa, Maman, Zabo, Anne-Claire, Gab, merci de m'avoir supportée ! Cyrille, Louise, Françoise, Bon Papa et Bonne Maman, Grand Maman et Grand Papa, mes oncles et tantes, Marraine, cousins et cousines (en particulier Timothée). Merci pour votre soutien !

RÉSUMÉ

ÉTUDE DE LA TOXICITÉ DU PEPTIDE A β ₄₂ DANS LA LEVURE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.

La maladie d'Alzheimer est la maladie neurodégénérative la plus fréquente chez l'Homme et constitue un enjeu économique et de santé publique majeur. Les cerveaux de patients atteints présentent une atrophie corticale associée à deux types de lésions : les dégénérescences neurofibrillaires, constituées de protéines Tau agrégées, et les plaques amyloïdes, composées majoritairement de peptides amyloïde beta A β agrégés. Les peptides A β et leur agrégation seraient à l'origine de la pathogenèse.

Afin d'éclaircir les mécanismes moléculaires à la base de la toxicité d'A β , nous avons construit un modèle de toxicité d'A β dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ce modèle a permis d'établir que la toxicité d'A β dans la levure est intimement liée à sa sécrétion et au trafic vésiculaire. Ce modèle nous a également permis de réaliser une étude structure-toxicité du peptide et de mettre en évidence des éléments en *cis* importants pour la toxicité d'A β . Une nouvelle voie d'agrégation des peptides toxiques en structure riche en feuillet β anti-parallèle a pu ainsi être mise en évidence.

Le modèle de toxicité d'A β et l'existence de variants très toxiques d'A β dans la levure nous a permis de réaliser des cribles génétiques afin de rechercher les éléments modulant la toxicité d'A β *in vivo*. Le trafic vésiculaire, en particulier l'endocytose *via* le remodelage du cytosquelette d'actine, un complexe responsable de la formation de vésicules intraluminales appelé ESCRT, forment autant de pistes à étudier pour améliorer notre compréhension de la toxicité d'A β .

Mots clés : levure, peptide A β , toxicité, étude structure-toxicité, oligomères antiparallèles, trafic intracellulaire.

ABSTRACT

TOXICITY STUDY OF BETA AMYLOID PEPTIDE A β ₄₂ IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.

Alzheimer's disease is the most common neurodegenerative disease. This pathology is caused by aggregation of A β peptides. The exact mechanism of neuronal cell dysfunction in Alzheimer's disease is poorly understood and numerous models have been used to decipher the mechanisms leading to cellular death.

In order to clarify the molecular mechanisms underlying the toxicity of A β , we generated a new model to study A β toxicity in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In our model, A β toxicity is closely related to its secretion and its intracellular traffic. Indeed, when A β is targeted to the secretory pathway, it is able to produce toxic species. Interestingly, we demonstrated also that even if A β is addressed to the secretory pathway, it is still able to form cytoplasmic aggregates.

Moreover, with this model, we generated new highly toxic mutants of A β by random mutagenesis. In order to correlate structural conformation 'signature' to A β toxicity, we performed a structure-toxicity study of these new variants. *In vitro*, we demonstrated that a new anti-parallel aggregation pathway is associated with highly toxic mutants of A β . Then, using our A β yeast model and also these harmful variants, we performed genetic screens in order to identify candidate genes able to modulate A β toxicity *in vivo*. Given these different screens, we found that vesicular trafficking, endocytosis *via* actin cytoskeleton remodeling, and ESCRT-III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) open new avenues to improve our understanding of A β toxicity.

Keywords: yeast, A β , toxicity, structure-toxicity study, antiparallel oligomers, intracellular trafficking.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ORALES

Publications

D'Angelo F, Vignaud H, DiMartino J, Salin B, Devin A, Cullin C, Marchal C. A yeast model for amyloid- β aggregation exemplifies the role of membrane trafficking and PICALM in cytotoxicity. *Disease Models and Mechanisms* 6:206-216 (2013)

Vignaud H, Bobo C, Lascu I, Sörgjerd KM, Zako T, Maeda M, Salin B, Lecomte S, Cullin C. A structure-toxicity study of A β_{42} reveals a new anti-parallel aggregation pathway. *PlosONE* 8(11):e80262 (2013)

Verduyck M, Vignaud H, Bynens T, Franssens V, Cullin C, Winderickx J. Yeast as a model for Alzheimer's disease : latest studies and advanced strategies. *Methods in Molecular Biology* (soumis)

Communications orales :

Levure Modèle et Outils 10^{ème} édition, 2 au 4 avril 2012

Conférence Jacques Monod - Protein misfolding in disease: molecular processes and translational research toward therapy, 13 au 17 Avril 2013

Communications par affiches :

Journée de l'école doctorale de Bordeaux 2, Arcachon Avril 2011

8th International Meeting on Yeast Apoptosis, Canterbury, 2 au 6 mai 2011

Journée de l'école doctorale de Bordeaux 2, Arcachon, Mars 2012

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	3
RESUME	5
ABSTRACT	7
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ORALES.....	9
TABLE DES MATIERES.....	11
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	15
INTRODUCTION.....	17
I. LES PROTEINES AMYLOÏDES.....	19
I.A. Historique	19
I.B. Propriétés des fibres amyloïdes	21
I.C. Repliement protéique, agrégation et amyloïdes	23
I.C.1. La théorie du « paysage énergétique » du repliement protéique.....	23
I.C.2. Formation des amyloïdes.....	24
I.D. Rôle physiologique des amyloïdes.....	26
I.D.1. Les amyloïdes fonctionnels chez les procaryotes.....	26
I.D.1.a. Curli	26
I.D.1.b. Chaplins	27
I.D.1.c. Harpins et Microcins.....	28
I.D.2. Les amyloïdes fonctionnels chez les eucaryotes.....	28
I.D.2.a. Les prions de levure.....	28
I.D.2.a.1. [PSI+]	29
I.D.2.a.2. [URE3]	29
I.D.2.a.3. Autres prions connus et candidats prions de levure	30
I.D.2.b. [HET-s].....	31
I.D.2.c. Les amyloïdes fonctionnels des mammifères.....	32
I.D.2.c.1. Pmel17.....	32
I.D.2.c.2. Le cas des hormones peptidiques	33
I.E. Les amyloïdes pathogènes	33
I.E.1. Les amyloses non-neurodégénératives	34
I.E.1.a. La chaîne légère des immunoglobulines	34
I.E.1.b. La transthyrétine (TTR).....	34
I.E.1.c. La Microglobuline β 2	35
I.E.1.d. L'apolipoprotéine A-1 (ApoA-1).....	35
I.E.1.e. La gelsoline	35
I.E.1.f. Le lysosyme.....	36
I.E.1.g. Le fibrinogène	36
I.E.1.h. L'amyloïde A.....	36
I.E.1.i. L'Islet Amyloid PolyPeptide IAPP	37
I.E.1.j. Les cristallines	37
I.E.2. Les affections du système nerveux central	38
I.E.2.a. Les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST)	38
I.E.2.b. La maladie de Parkinson (MP).....	39
I.E.2.c. La maladie de Huntington	40
II. LA MALADIE D'ALZHEIMER	42
II.A. Généralités	42
II.A.1. Historique.....	42
II.A.2. Symptômes, évolution et diagnostic	43
II.A.3. Épidémiologie.....	43
II.A.4. Les lésions histologiques	44
II.A.4.a. Les Dégénérescences NeuroFibrillaires (DNF)	44
II.A.4.b. Les plaques amyloïdes.....	46
II.B. Caractéristiques moléculaires de la MA.....	47

II.B.1.	La protéine Tau.....	47
II.B.2.	Les peptides A β et leur précurseur.....	48
II.B.2.a.	Clivages protéolytiques de l'APP et production des peptides A β	49
II.B.2.a.1.	α -sécrétase et APPs α	50
II.B.2.a.2.	β -sécrétase et APPs β	51
II.B.2.a.3.	γ -sécrétase et AICD.....	52
II.B.2.b.	Sites de production des peptides A β	53
II.C.	<i>Étiologie et pathogenèse de la MA</i>	56
II.C.1.	Les formes héréditaires de la MA.....	56
II.C.2.	Les facteurs de risque.....	59
II.C.2.a.	Les gènes de susceptibilité.....	59
II.C.2.b.	Les facteurs environnementaux.....	60
II.C.3.	La pathogenèse : l'hypothèse de la cascade amyloïde.....	60
II.C.4.	Agrégation et toxicité d'A β	61
II.C.4.a.	L'agrégation d'A β	61
II.C.4.b.	Les multiples mécanismes de toxicité d'A β	66
III.	LES MODELES D'ETUDE DE LA MA.....	69
III.A.	<i>Aβ et Rattus norvegicus</i>	69
III.B.	<i>Les modèles murins de la MA</i>	70
III.C.	<i>Aβ chez Drosophila melanogaster</i>	71
III.D.	<i>Études d'Aβ chez Caenorhabditis elegans</i>	73
III.E.	<i>Études d'Aβ chez Saccharomyces cerevisiae</i>	76
IV.	LES OBJECTIFS DE THESE.....	78
RESULTATS		80
I.	CREATION ET CARACTERISATION D'UN MODELE D'ETUDE DE LA TOXICITE D'A β ₄₂ DANS LA LEVURE SACCHAROMYCES CEREVISIAE.....	82
I.A.	<i>Introduction</i>	82
I.B.	<i>Article 1 : « a yeast model for Amyloid-β aggregation exemplifies the role of membrane trafficking and PICALM in cytotoxicity »</i>	84
I.C.	<i>Résultats complémentaires de l'article 1</i>	100
I.C.1.	La toxicité d'A β est allèle-dépendante.....	100
I.C.2.	Les effets d'A β sur les mitochondries.....	102
I.C.3.	Recherche de partenaires cellulaires d'A β	103
II.	ÉTUDE STRUCTURE - TOXICITE D'A β ₄₂	106
II.A.	<i>Introduction</i>	106
II.B.	<i>Article 2 : « A structure-toxicity study of Aβ₄₂ reveals a new anti-parallel aggregation pathway »</i>	107
II.C.	<i>Résultats complémentaires de l'article 2</i>	139
III.	RECHERCHE DE MODULATEURS CELLULAIRES DE LA TOXICITE D'A β	140
III.A.	<i>Les cribles génétiques</i>	140
III.B.	<i>Les voies impliquées dans la toxicité d'Aβ</i>	142
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		150
MATERIELS ET METHODES		163
I.	SOUCHES, MILIEUX ET PLASMIDES.....	163
II.	MUTAGENESE DIRIGEE.....	164
III.	MUTAGENESE ALEATOIRE.....	165
IV.	CRIBLE GENETIQUE ORDONNE.....	165
V.	IMMUNO-PRECIPITATION.....	166
VI.	MESURE DE LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE.....	166
ANNEXES		169
I.	TABEAU RECAPITULATIF DES CRIBLES GENETIQUES.....	169
II.	REVUE : « YEAST AS A MODEL FOR ALZHEIMER'S DISEASE: LATEST STUDIES AND ADVANCED STRATEGIES ».....	177
BIBLIOGRAPHIE.....		205

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

A β : Amyloïde β
ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase
ADDL : A β -Derived Diffusible Ligands
AICD : APP IntraCellular Domain
Apo : Apolipoprotéine
APP : Amyloid Precursor Protein
Arc : Mutant Arcic E22G d' A β
ARN : Acide RiboNucléique
BACE1 : β -site APP-Cleaving Enzyme 1
CCCP : Carbonyl Cyanide m-Chloro-Phenyl hydrazone
Cfu : Colony forming unit
C-ter : extrémité Carboxy-terminale
DNF : Dégénérescence NeuroFibrillaire
ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport
EST : Encéphalopathie Spongiforme Transmissible
HSP : Heat Shock Protein
IAPP : Islet Amyloid PolyPeptide
LFAO : Large Fatty Acid-derived Oligomers
MA : Maladie d' Alzheimer
MCJ : Maladie de Creutzfeldt Jakob
MH : Maladie de Huntington
MP : Maladie de Parkinson
N-ter : extrémité amino-terminale
PCR : Polymerase Chain Reaction
PrP : Protease resistant Protein
RE : Réticulum Endoplasmique
SAA : Apolipoprotéine A Sérique
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SFAO : Small Fatty Acid-derived Oligomers
TET : TriEthylTin
ThT : Thioflavine T
TTR : TransThyRétine
UPR : Unfolded Protein Response

INTRODUCTION

I. Les protéines amyloïdes

I.A. Historique

Le terme « amyloïde » fut introduit en 1854 par le médecin pathologiste allemand Rudolf Virchow. Il désigna par ce terme des structures cérébrales anormales, qui, comme l'amidon, présentaient une coloration bleu pâle après traitement à l'iode et viraient au violet après l'addition d'acide sulfurique. Initialement, « amyloïde » désignait des anomalies macroscopiques, des dépôts extracellulaires semblables à l'amidon, observés lors d'examens post mortem d'organes et de tissus de patients atteints de diverses affections (Figure 1). La nature protéique de ces dépôts fut établie dès 1859 par Friedreich et Kekule, cependant il fallut plus d'un siècle supplémentaire pour identifier les protéines les constituant.

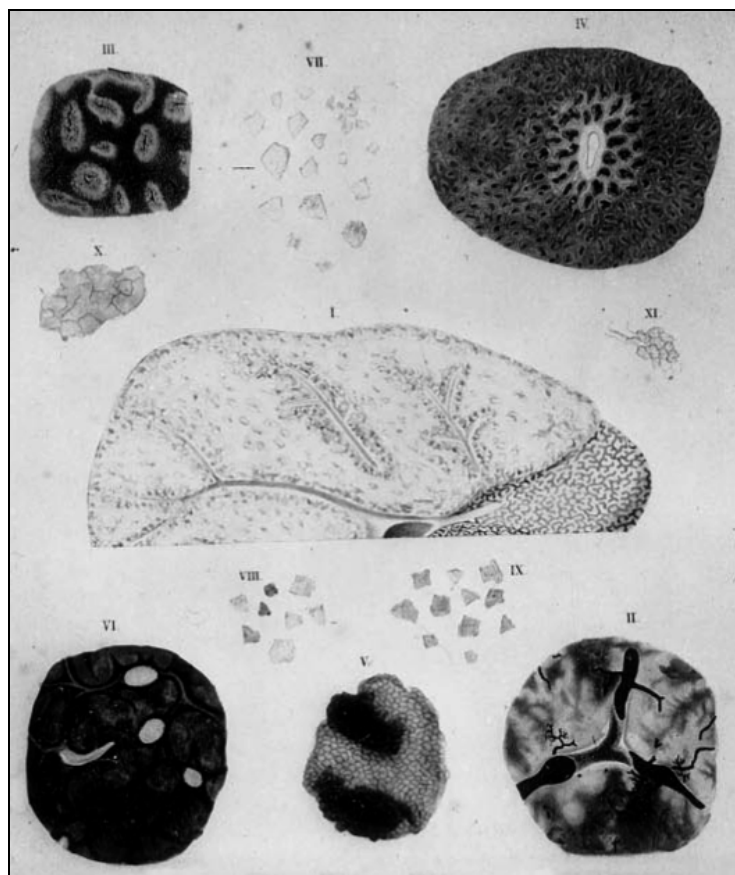


Figure 1 : Schémas de dépôts amyloïdes pathologiques attribués à Frerichs (1862) (Sipe and Cohen, 2000).

Grâce aux progrès techniques réalisés en microscopie couplée à des colorants histopathologiques, certaines propriétés structurales d'amyloïde ont pu être mises en évidence. En 1927, Divry et Florkin démontrèrent que les dépôts amyloïdes de différents tissus présentent une biréfringence en lumière polarisée, qu'ils soient ou non colorés au rouge Congo. Lorsqu'ils le sont, les dépôts amyloïdes pathologiques présentent une biréfringence verte en lumière polarisée (Figure 2). Ces critères de coloration et biréfringence furent les premiers adoptés pour caractériser les amyloïdes. En 1959, le caractère fibrillaire des amyloïdes fut établi par l'observation des dépôts amyloïdes en microscopie électronique (Cohen and Calkins, 1959).

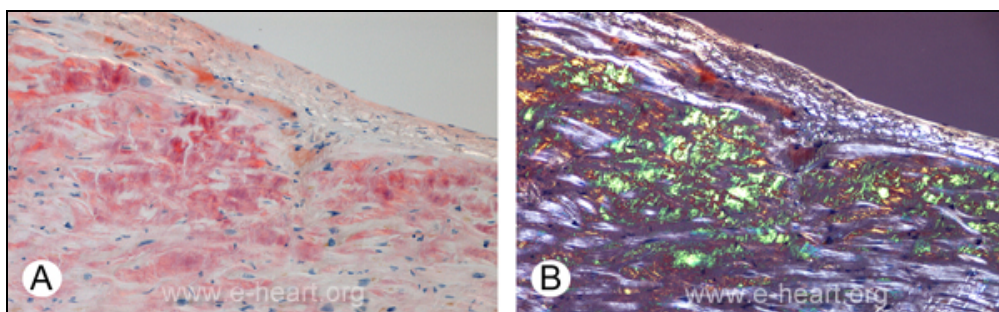


Figure 2 : Biréfringence d'amyloïde cardiaque coloré au rouge Congo.

Les dépôts amyloïdes sont colorés en rouge par le rouge Congo en microscopie optique (A), et présentent une biréfringence verte en lumière polarisée (B) (Source : www.e-heart.org).

Les connaissances sur « l'amyloïde » crûrent avec la qualité des purifications de fibres amyloïdes extraites de tissus. Les premières méthodes de purification étaient basées sur des séparations physiques, homogénéisation dans des tampons salins puis centrifugations différentielles (Cohen and Calkins, 1964). L'amélioration des purifications (Pras et al., 1968) permit l'identification de protéines constituant les dépôts amyloïdes, dévoilant ainsi leurs multiples natures. C'est en 1971 que George G. Glenner et ses collaborateurs séquencèrent les protéines purifiées d'amyloïdes hépatiques et spléniques. Ils identifièrent une chaîne légère d'immunoglobuline, de type kappa (Glenner et al., 1971). La même année, ils créèrent les

premières fibrilles *in vitro* présentant les caractéristiques des amyloïdes (Glenner et al., 1971). La nature diverse des protéines amyloïdes était pressentie. Elle fut confirmée lorsque, par la suite, d'autres protéines furent purifiées à partir de dépôts amyloïdes (Benditt and Eriksen, 1971). Ceci conduisit à un élargissement du champ d'étude des amyloïdes non plus à une protéine amyloïde seule, mais à une large classe de protéines.

I.B. Propriétés des fibres amyloïdes

Les fibres amyloïdes, bien que constituées de protéines différentes, possèdent des propriétés communes. Elles sont composées d'un seul type de protéines qui sont auto assemblées en feuillets β croisés ou « *cross-bêta* » (Figure 3). Les feuillets β y sont perpendiculaires à l'axe d'élongation de la fibre. Cette organisation en « *cross-bêta* » est responsable du profil de diffraction des rayons X, représenté en Figure 4, où un halo périphérique à 4,7 Angström correspond à la distance entre chaque brin β , un second halo à 10 Angström environ correspond à la distance entre les deux feuillets (Figure 3) (Sunde et al., 1997).

C'est également cette conformation en « *cross-bêta* » qui leur confère leur propriété de biréfringence, visible notamment par la biréfringence verte en lumière polarisée après coloration au rouge Congo. La richesse en feuillets β des fibres amyloïdes amène à des propriétés tinctoriales spécifiques comme la capacité à fixer le rouge congo et la thioflavine T (ThT). Ces affinités sont utilisées pour l'évaluation de l'élongation des fibres au cours de leur assemblage (Rogers, 1965).

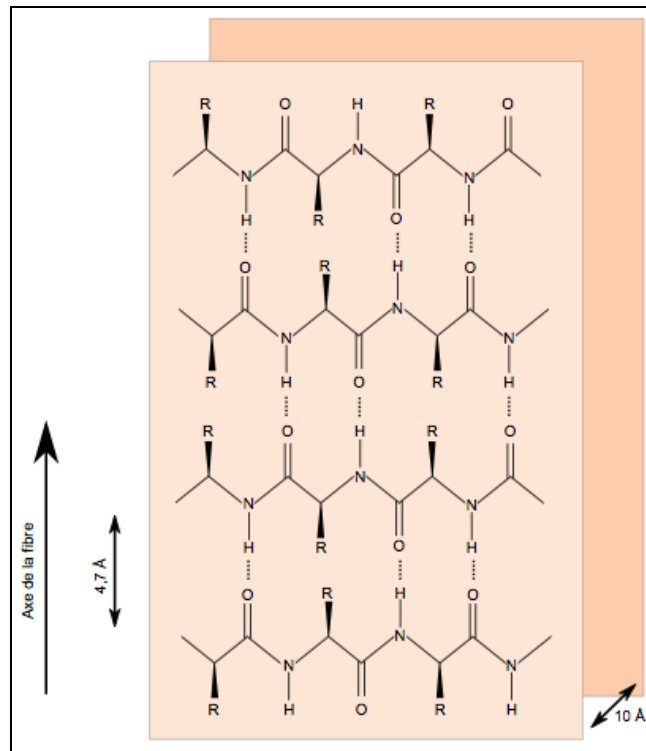


Figure 3 : Organisation « cross-bêta » caractéristique de fibres amyloïdes.

Les chaînes polypeptidiques s'agencent en feuillets β perpendiculaires à l'axe de la fibre. La distance entre deux brins β est d'environ 4,7 Å, et celle séparant deux feuillets est d'environ 10 Å.

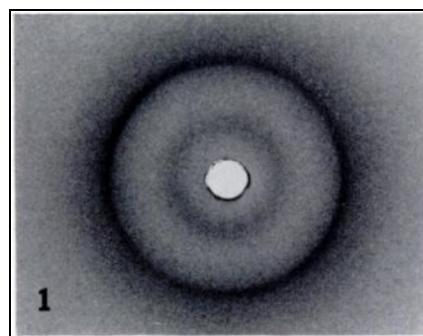


Figure 4 : Profil de diffraction des rayons X de fibres amyloïdes.

Ces fibres amyloïdes, purifiées à partir de foie et de rate, présentent un halot central correspond à environ 10 Å, et un anneau périphérique à environ 4,7 Å (Eanes and Glenner, 1968).

Cet état d'agrégation confère aux fibres amyloïdes une très grande stabilité, conduisant également à une résistance à la protéolyse et aux détergents.

I.C. Repliement protéique, agrégation et amyloïdes

I.C.1. La théorie du « paysage énergétique » du repliement protéique

Selon la théorie du « paysage énergétique » du repliement protéique, le processus du repliement suit un « entonnoir énergétique » dans lequel les intermédiaires conformationnels tendent progressivement vers l'état natif. L'état natif d'une protéine correspond presque toujours au repliement thermodynamiquement le plus stable. Comme les interactions natives entre les résidus d'une chaîne polypeptidique sont plus stables que les interactions non-natives, elles sont plus persistantes. L'augmentation progressive des interactions natives réduit rapidement les possibilités de repliement, et donc optimise l'acquisition de la structure tridimensionnelle native de faible énergie, conduisant au profil en entonnoir (Figure 5, partie de gauche : contacts intramoléculaires).

Les formes partiellement repliées ou mal repliées peuvent s'avérer problématiques du fait de leur forte propension à s'agréger. Les cellules possèdent des protéines chaperones prenant en charge ces intermédiaires, et permettant de les réengager dans le chemin de repliement natif (Figure 5, partie de droite : contacts intermoléculaires). La capacité à former des fibrilles amyloïdes semble être commune à beaucoup de protéines *in vitro*, cependant, *in vivo*, ces capacités sont fortement diminuées par l'action de ces chaperones.

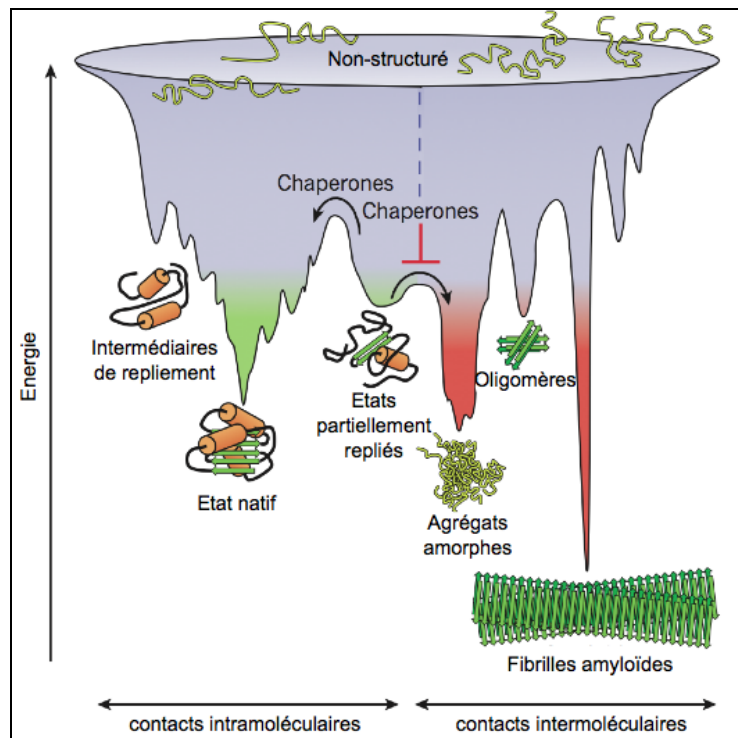


Figure 5 : Réactions de compétitions entre repliement protéique et agrégation.

Par l'établissement de contacts intramoléculaires (en vert), la protéine en cours de repliement se dirige vers sa forme native. Lorsque plusieurs molécules se replient simultanément, des contacts intermoléculaires peuvent s'établir, conduisant à la formation d'agrégats amorphes, d'oligomères ou de fibrilles amyloïdes (en rouge). Ceci est prévenu *in vivo* par des chaperones (d'après Hartl et al., 2011).

I.C.2. Formation des amyloïdes

In vitro, la cinétique de formation des fibres amyloïdes (mesurée par l'augmentation de la fluorescence de la ThT, la diffusion de la lumière ou toute autre technique) présente une phase de latence, suivie d'une phase de croissance rapide. Ce type de profil est caractéristique d'une fibrillation « nucléation-dépendante » (Jarrett and Lansbury, 1992; Naiki et al., 1991) (Figure 6).

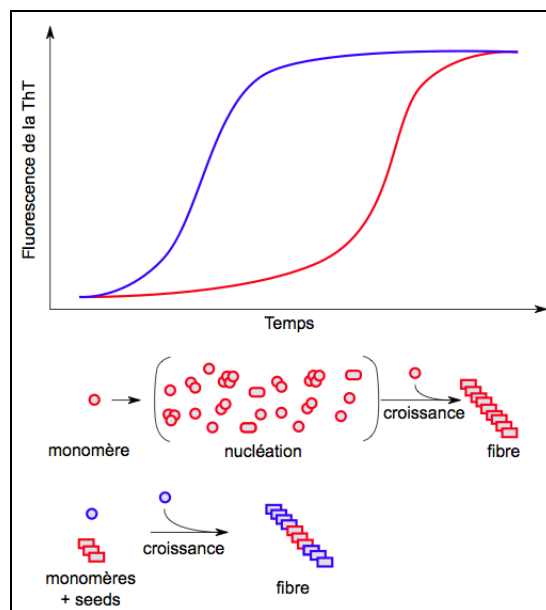


Figure 6 : Schéma de cinétiques de fibrillation.

En rouge, la cinétique de fibrillation présente une phase de latence suivie d'une phase de croissance rapide correspondant à une étape de nucléation lente, suivie d'une élévation des fibres rapides. En bleu, l'étape de nucléation est considérablement réduite par l'ajout de noyau de nucléation « *seeds* ».

La phase de latence correspond au temps nécessaire à la formation de « noyaux ». Une fois ces noyaux formés en quantité suffisante, les fibres s'allongent rapidement par l'association des monomères ou oligomères aux noyaux. La phase de latence peut être réduite voire même éliminée par l'ajout de fragments de fibres préformées, appelé « *seeds* » (semences, graines en français) (Jarrett and Lansbury, 1992). Dans ce cas, la formation de noyaux n'est plus limitante, et l'auto-assemblage se réalise directement sur les « *seeds* » (Figure 6, en bleu).

Les premières phases de fibrillation sont associées à la formation d'oligomères solubles. Ces intermédiaires sont très étudiés pour comprendre les étapes précoces de la fibrillation, mais également parce qu'ils sont associés à une cytotoxicité accrue (Bucciantini et al., 2002). Il s'agit particulièrement d'espèces oligomériques présentant des structures granulaires, annulaires ou « protofibrillaires » (Goldsbury et al., 1999; Bucciantini et al., 2002; Serio et al., 2000). Des anticorps synthétiques sont capables de reconnaître

spécifiquement ces espèces issues de différentes sources (α -synucléine, IAPP, polyglutamine, lysosyme, insuline et PrP(106-126) ou encore l'anticorps 11-1F4 qui reconnaît la chaîne légère de l'immunoglobuline, l'amyloïde sérique A, la transthyrétine, le lysosyme, l'ApoA1 et A β), mais pas les monomères ni les fibres finales (Hrncic et al., 2000; Kaye et al., 2003). Ceci suggère que ces espèces oligomériques possèdent des éléments structuraux communs.

I.D. Rôle physiologique des amyloïdes

Attendu que les amyloïdes ont été décrits dans le cadre de pathologies humaines, les fibres amyloïdes ont longtemps été considérées comme néfastes pour l'organisme les produisant. Depuis, d'autres protéines amyloïdes ont été identifiées comme « fonctionnelles ». En voici quelques illustrations.

I.D.1. Les amyloïdes fonctionnels chez les procaryotes

I.D.1.a. *Curli*

Un premier exemple de fibres amyloïdes fonctionnelles a été décrit chez certaines bactéries gram négative telles que *Escherichia coli* (Olsen et al., 1989). Il s'agit de Curli, un composant de la matrice extracellulaire produit lors de la croissance en biofilm (Figure 7).

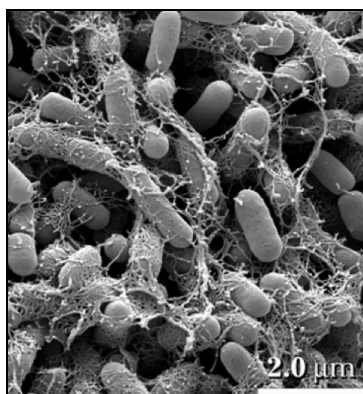


Figure 7 : Biofilm de bactéries *E.coli* en microscopie électronique à balayage.

Les fibres Curli forment un maillage dans la matrice extracellulaire (Uhlich et al., 2006).

Curli est constituée de protéines CsgA auto assemblées grâce à la protéine de nucléation de Curli CsgB. En effet, les cellules exprimant seulement CsgA la sécrète sous forme soluble. La présence de CsgB est nécessaire *in vivo* à l'assemblage de CsgA (Hammar et al., 1996) alors qu'*in vitro*, celle-ci s'auto assemble en fibre « curli-like » (Chapman et al., 2002). Ce mécanisme permet de découpler le processus de nucléation de celui de l'élongation, permettant ainsi de limiter l'exposition de la cellule à des intermédiaires de repliement potentiellement cytotoxiques.

Les fibres de Curli sont donc un composant majeur de la matrice extracellulaire produite au cours de la croissance en biofilm (Uhlich et al., 2006; Vidal et al., 1998). Elles sont impliquées dans les étapes initiales de la fixation aux cellules de l'hôte (Gophna, Oelschlaeger, Hacker, & Ron, 2002; Wang et al., 2006), induisent la réponse inflammatoire (Harrington et al., 2005), augmentent le taux de survie des bactéries, et leur résistance aux agents antibactériens (Uhlich et al., 2006).

I.D.1.b. Chaplins

Chez la bactérie filamenteuse *Streptomyces coelicolor* a été décrit une famille de 8 gènes codant pour des protéines appelées « chaplin » (Claessen et al., 2003; Elliot et al., 2003). Ces protéines sont impliquées dans la formation des hyphes aériens, régulant la différenciation morphologique des cellules.

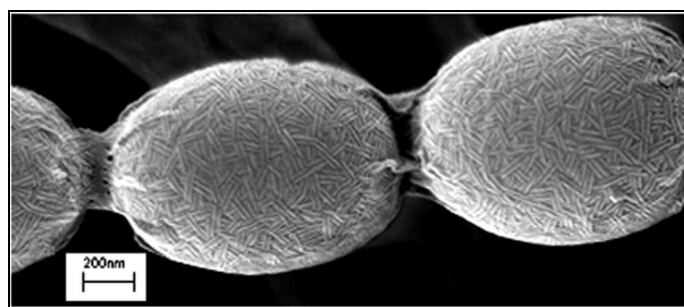


Figure 8 : Hyphes aériens de *Streptomyces coelicolor*.

Les hyphes, ici visible par microscopie électronique à balayage, sont tapissés de chaplins (Di Berardo et al., 2008).

Les chaplins sont sécrétées et peuvent s'auto assembler à l'interface air-eau. En milieu hydrophobe, ces fibres forment un manteau à la surface des hyphes, permettant ainsi leur croissance dans ces conditions (Figure 8). Un rôle dans l'attachement cellulaire a également été mis en évidence, *via* la formation de fimbriae (de Jong et al., 2009).

I.D.1.c. Harpins et Microcins

Les bactéries utilisent également les propriétés cytotoxiques d'amyloïdes. La microcin E942, aussi appelée Mcc, est produite au cours des phases exponentielle et stationnaire de croissance de la bactérie *Klebsiella pneumoniae*. Elle est responsable d'une perméation des membranes plasmiques des cellules pulmonaires par la formation de pores (de Lorenzo and Pugsley, 1985; Lagos et al., 1993). Au cours de la croissance des cellules et de sa production, Mcc s'auto assemble en fibres amyloïdes, perdant par cette agrégation ses propriétés de perméation (Bieler et al., 2005).

Les harpins sont des protéines bactériennes produites par des pathogènes de plantes et causant une réaction d'hypersensibilité (qui est l'équivalent de l'apoptose des cellules animales). L'harpin HpaG, produite par les bactéries *Xanthomonas*, présente lors de sa purification des structures oligomériques sphériques. Ces structures sont capables de former après quelque temps des fibres amyloïdes qui conservent leurs propriétés toxiques. D'autres harpins sont capables de former des structures fibrillaires : HrpN, HrpZ (Oh et al., 2007).

I.D.2. Les amyloïdes fonctionnels chez les eucaryotes

I.D.2.a. Les prions de levure

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est réputée pour ces protéines amyloïdes particulières, les prions. Les prions sont définis comme des agents infectieux non conventionnel, de nature protéique et dépourvus d'acides nucléiques (Prusiner, 1982;

Prusiner, 1997). Les premiers phénotypes prions [*PSI*⁺] et [*URE3*] ont été décrits respectivement par B. Cox en 1965 (Cox, 1965) et F. Lacroute en 1971 (Lacroute, 1971). Ce n'est que plus tard que ces phénotypes ont été associés à la présence de protéines prions (Wickner, 1994), puis que la démonstration a été apportée que les prions sont les formes amyloïdes des protéines correspondantes (King and Diaz-Avalos, 2004; Tanaka et al., 2004; Brachmann et al., 2005; Sparrer et al., 2000).

I.D.2.a.1. [*PSI*⁺]

[*PSI*⁺] correspond à la forme prion de la protéine Sup35p. Sup35p est un facteur de terminaison de la traduction. Sous forme prion, la majeure partie des Sup35p est séquestrée au sein des fibres amyloïdes et n'exerce plus leur fonction cellulaire. Ceci conduit à une diminution de l'activité de terminaison de la traduction, et donc à une translecture accrue des codons stop. Le passage de la forme cellulaire à la forme prion est spontané et concerne environ 1 cellule sur 10⁶ (Lund and Cox, 1981; Lancaster et al., 2010; Chernoff et al., 1999). La fréquence d'apparition du prion est augmentée lors de stress environnementaux (Tyedmers et al., 2008). En comparant la croissance de souches sauvages [*PSI*⁺] de différentes origines écologiques, à celle des mêmes souches curées du prion, il apparaît que la présence de prions produit des variations phénotypiques considérables, avantageuses ou néfastes. Les prions confèrent manifestement aux levures une plasticité qui leur permet d'explorer de nouveaux phénotypes en cas de confrontation à un environnement défavorable à leur croissance (Halfmann et al., 2012).

I.D.2.a.2. [*URE3*]

[*URE3*] est la forme prion de la protéine Ure2p (Wickner, 1994), dont le rôle est de séquestrer dans le cytoplasme deux activateurs de transcriptions Gln3 et Gat1 prévenant ainsi

la transcription de leurs gènes cibles lors de la croissance en milieu riche en sources préférentielles d'azote. Par cette interaction, Ure2p empêche la transcription de gènes dont les produits sont impliqués dans le métabolisme azoté. Sous forme prion, la séquestration de Gln3 est altérée et conduit à une expression constitutive de ses gènes cibles (Courchesne and Magasanik, 1988). La perte de fonction d'Ure2p, conséquence de son passage sous forme prion, peut donc modifier considérablement les capacités de la cellule à utiliser des sources alternatives d'azote. Ceci peut s'avérer profitable dans les conditions œnologiques de fermentation alcoolique de jus de raisin, conditions dans lesquelles la proline et l'arginine sont des sources d'azote majeures (Salmon and Barre, 1998).

I.D.2.a.3. Autres prions connus et candidats prions de levure

Plus d'une vingtaine de prions et de candidats prions de levure ont été décrits à ce jour (Tableau I). Parmi eux beaucoup sont des facteurs de transcription, de transduction ou des protéines de maturation des ARNs. L'existence de ces prions suggère que l'hétérogénéité phénotypique qu'ils procurent contribue à un mécanisme qui arme les levures contre les changements environnementaux. L'équipe de R. Halfman (Holmes et al., 2013) vient récemment de montrer que les teneurs en alcool et en oxygène de l'environnement régule l'apparition d'un prion particulier, appelé [MOT3] montrant ainsi que l'environnement peut contrôler l'apparition de ces prions.

Déterminant	État prion	Fonction	Conséquences de l'état prion
Sup35	<i>[PSI⁺]</i>	Terminaison de la traduction	Augmentation des suppressions non-sens, translecture, changement de stabilité d'ARNm
Ure2	<i>[URE3]</i>	Régulation de la transcription	Indifférenciation de l'utilisation sources d'azote
Rnq1	<i>[PIN⁺]</i>	Inconnue	Augmentation de l'apparition d'autres prions
Swi1	<i>[SWI⁺]</i>	Régulation de la transcription	Altération de l'utilisation de sources carbonées
Mca1	<i>[MCA]</i>	Régulation de l'apoptose	Inconnue
Cyc8	<i>[OCT⁺]</i>	Répression de la transcription	Altération de l'utilisation de sources carbonées, floculation
Mot3	<i>[MOT3⁺]</i>	Régulation de la transcription	Altération de la composition de la paroi
Pma1/Std1	<i>[GAR⁺]</i>	Pompe à protons (Pma1), voie de signalisation du glucose	Discrimination de l'utilisation de sources carbonées
?	<i>[IPS⁺]</i>	-	Neutralisation d'un suppresseur de mutation non-sens
19 autres protéines	-	Diverses	Indéterminé

Tableau 1 : Prions connus et soupçonnés de *Saccharomyces cerevisiae* (d'après Halfmann et al., 2010).

I.D.2.b. [HET-s]

Chez le champignon filamenteux *Podospora anserina*, les hyphes peuvent naturellement et spontanément fusionner. Cette fusion somatique peut être avorté lorsque les souches concernées sont incompatibles. Ce phénomène, appelé incompatibilité hétérocaryotique, est sous le contrôle d'un ensemble de gènes, repartis sur 9 loci « *het* ». L'un d'entre eux, le locus *het-s*, présente deux allèles : *het-s* et *het-S* (Turcq et al., 1991). L'allèle *het-s* est lui-même associé à deux phénotypes : [Het-s*], qui est compatible avec les souches [Het-S], et [Het-s] qui est incompatible avec les souches [Het-S] (Rizet, 1952). Ces phénotypes sont la conséquence des deux états de la protéine HET-s : [Het-s*] correspond à un état soluble de la protéine, tandis que le phénotype [Het-s] est associé à sa forme prion (Coustou et al., 1997).

L'incompatibilité hétérocaryotique s'exercerait par la transconformation de la protéine HET-S par le prion. C. Seuring et ses collaborateurs ont proposé le mécanisme suivant. Lors de la fusion d'hyphes de souches [Het-s] et [Het-S], les fibres constituées de protéines HET-s sous forme prion serviraient de matrice au repliement d'HET-S. Ceci entraîne un changement conformationnel de cette dernière, dévoilant des hélices auparavant masquées et favorisant son oligomérisation. Le prion activerait ainsi la toxine HET-S, qui agirait en formant des pores membranaires, conduisant *in fine* à la mort de la cellule hétérocaryotique (Seuring et al., 2012).

L'incompatibilité hétérocaryotique résultant de [het-s] et [het-S] contribuerait à limiter la propagation d'éléments génétiques infectieux comme les virus ou les plasmides tels que le plasmide de sénescence pAL2-1 (Debets et al., 2012).

I.D.2.c. Les amyloïdes fonctionnels des mammifères

I.D.2.c.1. Pmel17

Chez les mammifères, la plupart des protéines amyloïdes décrites sont responsables de pathologie. Cependant, il en est une impliquée dans les mécanismes de défense contre les rayons ultraviolets. Pmel17 est une protéine transmembranaire produite dans les cellules spécialisées dans la synthèse de mélanine comme les mélanocytes ou les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. Elle subit un clivage lors de son passage dans le trans-golgi qui conduit à la production d'un fragment d'environ 80 kD, appelé M α . Ce fragment s'auto assemble en fibres amyloïdes qui conditionnent l'agrégation de la mélanine et la maturation des mélanosomes, les compartiments cellulaires spécialisés dans la synthèse et le stockage de la mélanine (Fowler et al., 2006; Berson et al., 2003).

I.D.2.c.2. Le cas des hormones peptidiques

Certaines cellules endocrines et exocrines stockent leurs protéines et peptides dans des granules de sécrétion. Ces granules présentent un cœur dense constitué de protéines agrégées. Certaines hormones peptidiques forment *in vitro* des fibres amyloïdes. Ces fibres sont capables de relarguer des monomères actifs. Les granules purifiés de cellules de souris ou de rat tout comme les coupes de tissus montrent les caractéristiques des fibres amyloïdes (Maji et al., 2009). Les fibres amyloïdes constitueraient donc des modes de stockages d'hormones peptidiques au sein de compartiments vésiculaires dédiés et immédiatement disponibles.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'étude des protéines amyloïdes s'est historiquement concentrée sur les amyloïdes pathogènes, qui sont majoritaires chez les mammifères. Certains d'entre eux sont décrits dans les paragraphes suivants.

I.E. Les amyloïdes pathogènes

Les amyloses ou amyloïdoses se caractérisent par des dépôts protéiques insolubles dans les tissus. De nombreux organes peuvent être touchés : le rein, le foie, le cœur, le tube digestif, la peau et même le système nerveux central et périphérique. Une vingtaine de protéines amyloïdes différentes ont été associées à ces amyloses. Les symptômes varient selon les organes touchés et les protéines impliquées (Sipe et al., 2010; Merlini and Bellotti, 2003).

I.E.1. Les amyloses non-neurodégénératives

Dans de nombreux cas, l'amylose concerne d'autres organes que le système nerveux central. Les protéines amyloïdes s'accumulent dans les tissus, et ne peuvent pas être détruit par l'organisme. Ceci conduit à la destruction partielle ou complète de l'organe touché. La gravité de l'amylose dépend donc souvent du tissu concerné (décrits dans les revues suivantes Sipe et al., 2010; Merlini and Bellotti, 2003).

I.E.1.a. La chaîne légère des immunoglobulines

Les amyloses associées aux dépôts amyloïdes de chaîne légère des immunoglobulines peuvent toucher tous les organes, excepté le système nerveux central. Le rein est le plus souvent affecté (deux tiers des patients). Les chaînes légères des immunoglobulines sont produites par les plasmocytes et la moelle osseuse. Un excès de chaînes légères libres est retrouvé chez les patients, particulièrement les chaînes légères de type lambda, promptes à s'auto assembler. Ces assemblages se forment dans différents tissus, conduisant à des signes cliniques très variés. La toxicité serait un effet mécanique des dépôts ou pourrait être le fruit d'intermédiaires de repliements cytotoxiques (Palladini et al., 2006).

I.E.1.b. La transthyrétine (TTR)

La TTR est une protéine du plasma, présente également dans le liquide céphalo-rachidien, synthétisée entre autres par le foie. Elle est le transporteur d'une hormone thyroïdienne, la thyroxine T4, et de la vitamine A via son interaction avec la « retinol-binding-complex » (Nilsson et al., 1975). Elle agit sous forme homo-tétramérique. Plusieurs mutations sont responsables de neuropathies familiales, parfois associées à des manifestations cardiaques, oculaires ou hépatiques (McCutchen et al., 1995).

Plus d'une centaine de mutations responsables de ces neuropathies conduisent à une diminution de la stabilité du tétramère, et de sa dissociation en monomère et à leur agrégation en fibres amyloïdes (McCutchen et al., 1993).

I.E.1.c. La Microglobuline $\beta 2$

La microglobuline $\beta 2$ est la chaîne légère du complexe majeur d'incompatibilité de type I, complexe impliqué dans la reconnaissance du soi, présent à la surface de toutes les cellules. Dans certaines pathologies rénales, la microglobuline $\beta 2$ n'est plus excrétée par le rein et s'accumule dans le sang. Cette accumulation peut conduire à la formation de dépôts amyloïdes dans les tissus riches en collagène (os, ligaments, synovies...) (Gejyo et al., 1985; Gorevic et al., 1985; Eichner and Radford, 2011).

I.E.1.d. L'apolipoprotéine A-1 (ApoA-1)

L'apoA-1 est une protéine du plasma, synthétisée par le foie et l'intestin grêle, chargée du transport de lipides dans le sang (Mahley et al., 1984). Seize mutations sont associées à des amyloses touchant des organes différents en fonction de la position de la mutation. Les mutations dans la partie N-terminale (1-75) conduisent à des manifestations hépatiques ou rénales, tandis que les mutations affectant la partie C-terminale (173-178) sont responsables d'amyloses touchant le cœur, la peau ou le larynx. La mutation Gly26Ala conduit à des amyloses neuropathiques (Sorci-Thomas and Thomas, 2002).

I.E.1.e. La gelsoline

La gelsoline est une protéine cytoplasmique impliquée dans la régulation de la polymérisation du cytosquelette d'actine. Elle se fixe aux filaments d'actine en présence de fortes concentrations de calcium, et conduit à la dissociation des monomères d'actine. Elle se

fixe aussi aux extrémités positives des filaments d'actine pour en empêcher la re-polymérisation. Dans des formes extrêmement rares d'amyloses, des fragments de gelsoline s'auto assemblent en fibres amyloïdes, et conduisent à une dystrophie cornéenne et une neuropathie crânienne et périphérique (Solomon et al., 2012).

I.E.1.f. Le lysosyme

Le lysosyme est une hydrolase acide présente dans les sécrétions physiologiques telles que les larmes, la salive ou le mucus. Il possède une action bactéricide, par son activité d'hydrolyse des parois des bactéries gram positives. Il facilite également la phagocytose par les leucocytes de ces bactéries. Certaines mutations déstabilisent la structure tridimensionnelle du lysosyme et conduisent à son agrégation en fibres amyloïdes, affectant les glandes salivaires, la langue ou encore les glandes lacrymales (Pepys et al., 1993).

I.E.1.g. Le fibrinogène

Le fibrinogène, synthétisé par le foie, est un facteur de coagulation circulant qui se change en fibrine au cours de la coagulation. Des mutations de la chaîne alpha du fibrinogène A sont associées à des amyloses rénales familiales (Asl et al., 1998).

I.E.1.h. L'amyloïde A

L'amyloïde A est le produit de clivage de la SAA (Apolipoprotéine Amyloïde A sérique). La SAA est produite par les hépatocytes, sous le contrôle de l'interleukine 6. Lors d'inflammations chroniques ou d'arthrites rhumatoïdes, la production de SAA augmente. La production de l'amyloïde A est également augmentée, et provoque l'agrégation du peptide. Par ailleurs, l'injection ou l'ingestion de fibres d'amyloïde A accélérerait l'agrégation des peptides endogènes (Rosenthal et al., 1976).

I.E.1.i. L'Islet Amyloid PolyPeptide IAPP

L'IAPP pour Islet Amyloid PolyPeptide est responsable de certains diabètes de type II. Ce peptide est produit par les cellules β des îlots de Langerhans, et est sécrété avec l'insuline. Il semblerait que l'IAPP ait un rôle d'hormone pancréatique, au même titre que l'insuline et le glucagon. Les diabètes de type II sont caractérisés par une résistance de l'organisme à l'insuline, provoquant en réaction une surproduction à la fois de l'insuline, mais aussi de l'IAPP. Cette surproduction conduit à l'agrégation de l'IAPP dans les cellules pancréatiques, provoquant leur apoptose et l'aggravation du diabète (Clark et al., 1987).

I.E.1.j. Les cristallines

Les cristallines, protéines naturellement riches en feuillets β , sont présentes au niveau du cristallin, lui conférant sa grande stabilité et sa transparence. Certaines mutations ponctuelles peuvent conduire à une déstabilisation de ces cristallines et provoquer leur agrégation en fibres amyloïdes. Ces dépôts sur la cornée sont alors responsables d'une cataracte précoce (Meehan et al., 2004).

La toxicité des protéines amyloïdes associées à des processus pathologiques non neurodégénératifs semble être davantage liée à une perte de fonction de la protéine native ou à des dépôts ingérables pour l'organisme qu'à une toxicité propre des agrégats formés.

D'autres protéines amyloïdes pathogènes très étudiées sont associées à des maladies neurodégénératives. Ces pathologies sont abordées ci-dessous.

I.E.2. Les affections du système nerveux central

I.E.2.a. Les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST)

Les EST humaines peuvent être subdivisées en trois grands groupes : les formes sporadiques de la maladie de Creutzfeldt Jakob (MCJ), les formes génétiques (MCJ génétiques (revues (Ahmad et al., 2012; Gambetti et al., 2003)), l'insomnie fatale familiale (Gambetti et al., 1995) et le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (Hainfellner et al., 1995)) et enfin les formes acquises (le Kuru (Gajdusek and Zigas, 1957), les formes iatrogènes de la MCJ (Duffy et al., 1974) et les « nouvelles variantes » de la MCJ (Will and Zeidler, 1996)). D'autres animaux sont touchés par les EST. Les plus connues sont la tremblante du mouton (Scrapie) et la maladie de la « vache folle » (encéphalopathie spongiforme bovine) (Hope et al., 1988), du fait des crises sanitaires qu'elle a provoquée (Prusiner, 1997). Le vison (Hadlow and Karstad, 1968), le cerf muet (Williams and Young, 1980), le chat (Pearson et al., 1991) ou encore les bovidés africains et orientaux (Jeffrey and Wells, 1988 ; Kirkwood et al., 1990 ; Pearson et al., 1991) peuvent aussi développer des EST.

Ces pathologies ont en commun une incubation longue et silencieuse suivie d'une évolution progressive rapide jusqu'au décès, provoquée par une dégénérescence du système nerveux central, avec des lésions spécifiques et une accumulation de la PrP (pour *Protease resistant Protein*) sous sa forme prion (PrP^{Sc}).

La conversion d'une forme cellulaire PrP^C en une forme prion PrP^{Sc} est à l'origine de la pathogenèse. PrP^C est une protéine ubiquitaire de 208-209 acides aminés codée par le gène *PRNP*, liée à la membrane par une ancre GPI. Des orthologues de *PRNP* sont retrouvés chez les mammifères (Lysek et al., 2005), mais aussi les oiseaux, les amphibiens, les reptiles ou encore les poissons (Calzolari et al., 2005). La fonction physiologique de PrP^C n'est pas clairement établie (revue (Guillot-Sestier and Checler, 2012)) Une pléthore de rôles biologiques lui est attribuée : protection cellulaire contre les stress, rôle anti-apoptotique,

transport de cuivre ou encore des fonctions dans la structure, la formation et la maintenance des synapses. Une hypothèse récente fait de PrP^C un récepteur du système immunitaire qui transduirait des signaux du danger en détectant la présence d'oligomères amyloïdes riches en feuillets β . En effet, PrP^C médie l'inhibition de la potentialisation à long terme (Long-Term Potentiation, LTP) des peptides A β (Lauren et al., 2009).

Les bases moléculaires de la conversion de PrP^C en PrP^{Sc} restent un intense sujet d'étude. Les régions de la protéine impliquées dans la conversion ne sont pas identifiées clairement (revue (Prigent and Rezaei, 2011)). De la même manière, les mécanismes moléculaires de la toxicité associée à la présence du prion sont flous (Aguzzi et al., 2007). Quelles sont les espèces impliquées et comment agissent-elles ?

L'existence de nombreux phénotypes pathologiques différents et de leur transmissibilité sont à l'origine du concept de souche prion (Pattison and Millson, 1961). En effet, les formes cliniques des encéphalopathies spongiformes varient et sont associées à des profils d'agrégation, des temps d'incubation, des profils de lésions physiopathologiques et des zones atteintes différents (Mahal et al., 2007). Les isolats infectieux correspondant constituent des souches prions différentes. Les bases moléculaires de ces souches sont encore mal comprises. Les souches PrP^{Sc} différentes exposent différents épitopes, et présentent des différences de stabilité (Bessen and Marsh, 1994; Collinge et al., 1996; Telling et al., 1996). Les états de glycosylation joueraient également un rôle (Collinge, 2005).

I.E.2.b. La maladie de Parkinson (MP)

La MP est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte des neurones dopaminergiques de la substance grise, conduisant à des déficits moteurs incapacitants. Les cerveaux des patients présentent des lésions particulières : des inclusions cytoplasmiques appelées « corps de Lewy » et « neurites de Lewy ». Ces lésions sont présentes dans beaucoup

de régions du cerveau, particulièrement dans la substance grise (Figure 9). Ces structures de Lewy sont composées majoritairement d' α -synucléine (Spillantini et al., 1997) sous forme agrégée en amyloïde (Spillantini et al., 1998). L' α -synucléine est une protéine de 140 acides aminés, non repliée sous forme native (Weinreb et al., 1996). Cette protéine, dont la fonction est méconnue, est enrichie au niveau des terminaisons présynaptiques. La neurotoxicité serait associée à des espèces oligomériques de l' α -synucléine (Danzer et al., 2007; Outeiro et al., 2008).

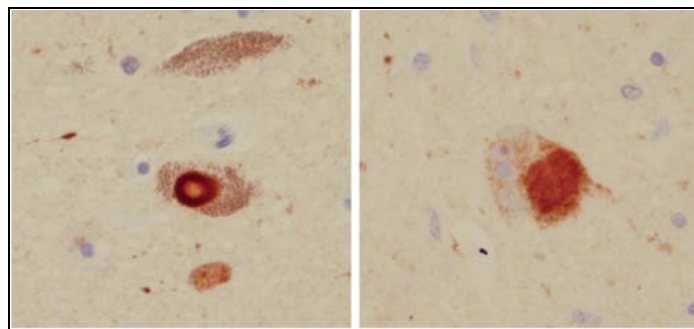


Figure 9 : Marquage immunohistochimique de l' α -synucléine.

Dans des neurones de la substance grise de patients atteints de MP, des particules d' α -synucléine s'agrègent sous forme de corps de Lewy marqués ici en marron (Dickson, 2012).

I.E.2.c. La maladie de Huntington

La maladie de Huntington est une maladie neurodégénérative héréditaire, caractérisée par des troubles moteurs (chorée) et cognitifs aboutissant à la perte d'autonomie et la mort des patients. La MH est associée au gène *HD* qui présente une répétition excessive du triplet CAG (36 répétitions au moins) (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). La protéine Huntingtin Htt codée par ce gène contient alors une extension de la région poly-glutamine en N-ter. L'augmentation du nombre de glutamine conduit à une protéolyse préférentielle, et à l'agrégation de ces protéines (Goldberg et al., 1996; Li and Li, 1998). Elles forment alors des inclusions nucléaires (DiFiglia et al., 1997), marqueurs de la pathologie.

Htt semble jouer divers rôles, notamment au cours du développement. La délétion du gène HD murin est létale dès les premiers jours du développement embryonnaire (Nasir et al., 1995; Duyao et al., 1995). Elle régulerait entre autre le trafic vésiculaire neuronal et ainsi la plasticité synaptique (Gauthier et al., 2004; Her and Goldstein, 2008). Les mécanismes moléculaires à l'origine de cette neurotoxicité sont actuellement inconnus. Les inclusions nucléaires ne sont pas responsables de la neurotoxicité (DiFiglia et al., 1997), mais la localisation nucléaire de Htt semble être nécessaire à sa toxicité (Saudou et al., 1998).

La partie suivante aborde en détail la maladie neurodégénérative la plus fréquente chez l'Homme : la maladie d'Alzheimer (MA).

II. La Maladie d'Alzheimer

II.A. Généralités

II.A.1. Historique

C'est en 1907 qu'un médecin allemand, Aloïs Alzheimer, décrit le cas d'une patiente démente de 48 ans. Cette femme présentait des troubles de la mémoire, de compréhension et d'orientation et des hallucinations visuelles. L'âge de la patiente excluait son cas des démences préalablement référencées. Après son décès, l'observation des tissus cérébraux permit de mettre en évidence des lésions jusqu'alors inconnues : les dégénérescences neurofibrillaires (DNF), constituées d'amas de fibrilles intracellulaires (Figure 10 et Figure 11). Les tissus cérébraux présentaient également des plaques séniles, dépôts extracellulaires retrouvés dans d'autres cas de démences séniles (Alzheimer, 1907; Alzheimer et al., 1995).

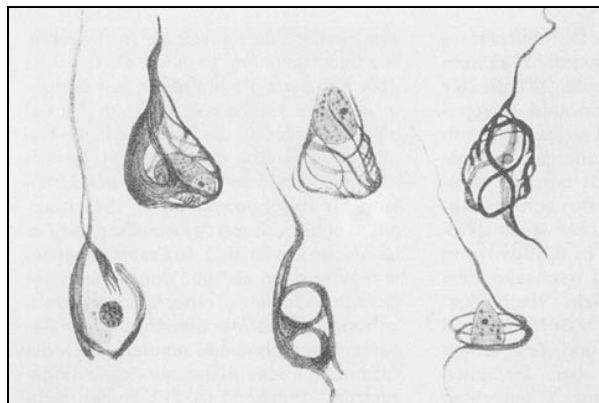


Figure 10 : Dessins originaux des dégénérescences neurofibrillaires.

Dessins réalisés par Aloïs Alzheimer lors de l'observation post-mortem du cerveau de la patiente démente (Source : www.alzheimer.adna.com).

En 1912, Emil Kraepelin individualise la « maladie d'Alzheimer » comme la démence des sujets jeunes, en opposition aux « démences séniles », les démences vasculaires des sujets âgés (Kraepelin, 1912).

II.A.2. Symptômes, évolution et diagnostic

Les patients présentent au stade les plus précoces de la MA un déclin graduel de la mémoire avec une incapacité à retenir les informations acquises récemment. D'autres aires cognitives sont progressivement touchées (langage, raisonnement abstrait, fonction exécutive et prise de décision), conduisant à une perte totale d'autonomie. Des modifications de l'humeur accompagnent souvent le déclin de la mémoire. D'autres symptômes tels que la dépression, l'hypertonie (co-contraction de couples musculaire agoniste-antagoniste), la myoclonie (contraction musculaire rapide et involontaire et de faible amplitude), l'incontinence ou le mutisme peuvent apparaître au cours de la pathologie. Le décès résulte d'une inanition générale, de malnutrition et d'infections bronchiques 8 à 12 ans après le diagnostic. Le diagnostic est basé sur l'histoire clinique, des examens neurologiques et des tests neuropsychologiques. L'examen post mortem permet de valider le diagnostic par la présence de plaques séniles et de DNF. Dans environ 90 % des cas, le diagnostic est confirmé (Castellani et al., 2010).

II.A.3. Épidémiologie

La MA est la démence la plus commune, représentant 50 à 60% des cas. La prévalence varie selon les zones géographiques. En France, elle est inférieure à 1% chez les individus de 60 à 64 ans. Elle augmente exponentiellement avec l'âge, atteignant 24 à 38% pour les individus de plus de 85 ans. On estime à plus de 860 000 les personnes atteintes en France. Selon les prévisions, elles seront près de 1,2 million en 2020. Les dépenses annuelles par personne atteinte s'élève à 22 099 euros. Les dépenses nationales atteindraient 20 milliards d'euros en 2020 en France (Source : Rapport parlementaire sur la maladie d'Alzheimer, 2005). À l'échelle mondiale, comme à l'échelle nationale, la lutte contre la maladie

d'Alzheimer est une question prioritaire de santé publique, et la prise en charge des patients représente un enjeu économique majeur.

II.A.4. Les lésions histologiques

II.A.4.a. Les Dégénérescences NeuroFibrillaires (DNF)

Initialement décrites en 1907 par Aloïs Alzheimer, les DNF sont la manifestation histologique de l'agrégation de la protéine Tau phosphorylée (Figure 11) (Wood et al., 1986) (Ihara et al., 1986). Tau est impliquée dans la stabilisation des microtubules (Weingarten et al., 1975), en particulier au niveau axonal (Binder et al., 1985). Son activité est régulée par sa phosphorylation (Drechsel et al., 1992).

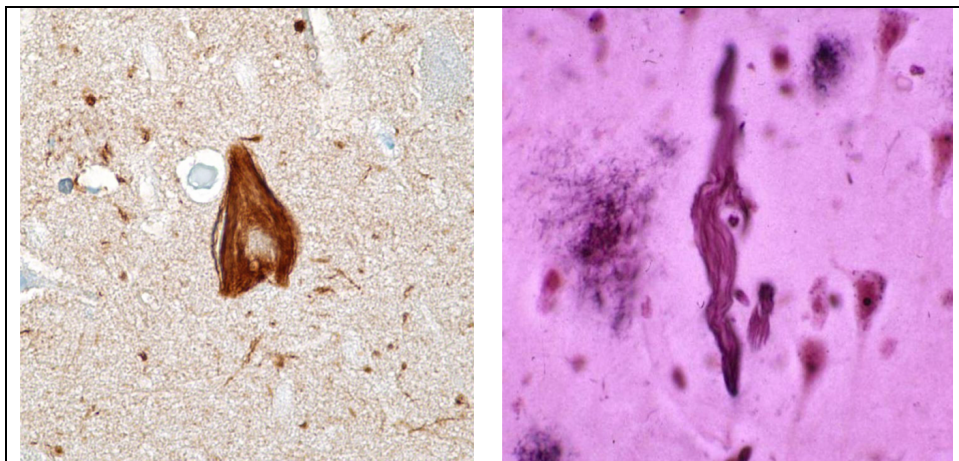


Figure 11 : Dégénérescences NeuroFibrillaires.

À gauche, un marquage immunohistochimique de Tau (coloration marron). À droite, après coloration de Bielschowsky (Castellani et al., 2010).

Dans les DNF, la protéine Tau est anormalement phosphorylée (Goedert et al., 1992; Lee et al., 1991).

L'agrégation de Tau caractérise d'autres maladies neurodégénératives, appelées « tauopathies », dans lesquelles est retrouvé ce type de lésions.

Ces lésions se propagent au cours du développement pathologique. Les DNF sont, dans les premiers stades de la maladie, localisés dans le cortex trans-entorhinal (Figure 12 A) et l'hippocampe (Figure 12 B), et s'étendent progressivement au cortex temporal (Figure 12 C), puis dans toutes les régions corticales associatives polymodales (Figure 12 D) puis unimodales. Elles finissent par envahir toutes les régions corticales (Figure 12 E).

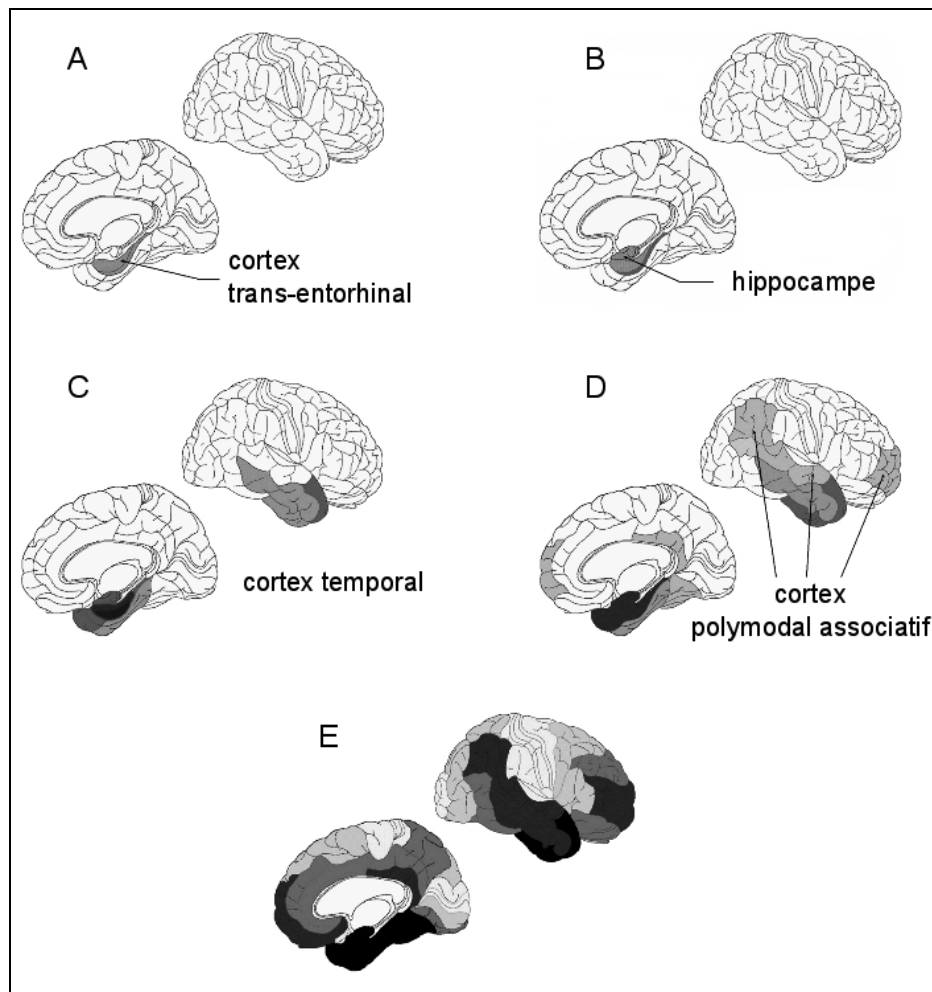


Figure 12 : Progression de l'apparition des DNF au cours de la MA.

Pour chaque panneau, la vue en haut à droite correspond à la face externe, la vue de gauche à la face interne de l'hémisphère droit. Dans les premiers stades de la MA, les DNF sont localisés dans le cortex trans-entorhinal (A) et l'hippocampe (B). Ces lésions s'étendent rapidement au cortex temporal (C) puis aux cortex polymodal associatif (D). Aux derniers stades de la MA, les DNF envahissent l'ensemble des régions corticales (E) (Delacourte et al., 1999).

Les plaques amyloïdes se retrouvent dans l'ensemble du cortex cérébral, et s'intensifient au cours de la pathologie.

La répartition des DNF et leur évolution reflète davantage la sévérité de la pathologie que celles des plaques amyloïdes.

II.A.4.b. Les plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes, ou plaques séniles, sont des dépôts extracellulaires d'un diamètre compris entre 15 et 200 μm , composées de faisceaux de filaments compacts (Figure 13). Ces filaments sont majoritairement constitués de peptides A β (Amyloïde β).

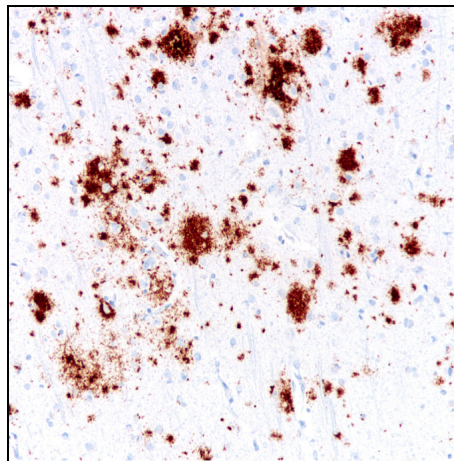


Figure 13 : Plaques amyloïdes.

Sur cette coupe du cortex cérébral d'un patient, les plaques amyloïdes sont marquées par immunohistochimie en utilisant des anticorps anti-A β (marquage marron) (Castellani et al., 2010).

Une grande diversité d'autres constituants ont été identifiés : l'apolipoprotéine E (ApoE) (Namba et al., 1991), le peptide p3, des protéoglycanes, des facteurs du complément, des immunoglobulines ou encore des protéines de la matrice extracellulaire. La présence d'ions Zn^{2+} , Cu^{2+} ou Fe^{3+} a été décrite (Lovell et al., 1998).

II.B. Caractéristiques moléculaires de la MA

II.B.1. La protéine Tau

Le gène de structure de la protéine Tau est localisé sur le chromosome 17 (Neve et al., 1986). Suite à un épissage alternatif, 6 isoformes de Tau sont présentes dans le cerveau adulte (Goedert et al., 1989).

La protéine Tau présente 5 répétitions de 31 résidus dans sa partie C-ter qui sont impliquées dans sa liaison aux microtubules (Gustke et al., 1994). Les microtubules sont des éléments du cytosquelette possédant des rôles de stabilisateur de la morphologie cellulaire, au cours de la mitose et dans le transport intracellulaire. Tau, par sa liaison, stabilise les microtubules (Weingarten et al., 1975) et promeut leur assemblage (Cleveland et al., 1977). Les phosphorylations de Tau tendent à affaiblir sa liaison aux microtubules (Bramblett et al., 1993; Lindwall and Cole, 1984; Hoshi et al., 1987).

L'agrégation de Tau est un marqueur de la MA. Les mécanismes impliqués dans son agrégation sont méconnus. Les protéines Tau agrégées dans les DNF présentent une hyperphosphorylation (Goedert et al., 1992; Ihara et al., 1986; Lee et al., 1991; Wood et al., 1986). La relation entre phosphorylation et agrégation n'est cependant pas encore établie clairement. En effet, certaines formes hautement phosphorylées de Tau seraient promptes à s'agréger (Alliegro, 2000; Alonso et al., 2001; Maeda et al., 2007; Vandebroek et al., 2005). Il est cependant envisageable que l'hyperphosphorylation survienne après l'agrégation de Tau. D'autres modifications (protéolyse, glycosylation, etc.) et des co-facteurs (Apolipoprotéine E, Glycosaminoglycanes, etc.) pourraient être impliqués dans son agrégation.

Les causes de l'hyperphosphorylation de Tau dans la MA ne sont pas connues. Une augmentation des activités kinases ou une diminution des activités phosphatases pourraient être impliquées. L'agrégation, quant à elle, serait à l'origine d'une déstabilisation des

microtubules, une altération du transport axonal, conduisant à des perturbations des connexions synaptiques, et à la mort cellulaire.

II.B.2. Les peptides A β et leur précurseur

Les peptides A β constituant les plaques amyloïdes sont issus du clivage d'une protéine transmembranaire ubiquitaire appelée APP (*Amyloid Precursor Protein*). L'APP est une protéine transmembranaire de type I, présentant un large domaine extracellulaire et un domaine cytoplasmique court. Son gène de structure est localisé sur le bras long du chromosome 21. Suite à un épissage alternatif, plusieurs isoformes de l'APP de 365 à 770 résidus sont formées. Les peptides A β sont majoritairement issus des isoformes de 695, 751 et 770 acides aminés. L'isoforme 695 semble être exclusivement exprimée dans les neurones. Les raisons de cet épissage alternatif tissu-spécifique ne sont pas encore établies. L'APP est très conservée au cours de l'évolution. Il existe deux gènes homologues eux-mêmes conservés, codant pour APLP1 et APLP2 (*APP-like Protein*). Elles ne présentent cependant pas d'homologie de séquence avec la partie A β de l'APP.

Bien qu'ils ne soient pas encore entièrement compris, les rôles physiologiques de l'APP ont été intensivement étudiés. APP aurait un rôle dans les interactions cellule-cellule et cellule-milieu extracellulaire, importantes notamment au cours du développement, lors de la migration cellulaire (Young-Pearse et al., 2007; Rice et al., 2012; Soba et al., 2005; Pramatarova et al., 2008; Ghiso et al., 1992; Schubert et al., 1989). Son rôle dans la régulation de la croissance des neurites et la synaptogenèse a été soulevé (Leyssen et al., 2005; Kotulska et al., 2010). APP a aussi été décrite comme un récepteur de la F-Spondin, une glycoprotéine sécrétée par les neurones (Ho and Südhof, 2004). APP interagit aussi avec la netrin-1, molécule soluble impliquée dans la croissance axonale par chimiotactisme (Lourenço et al., 2009).

II.B.2.a. Clivages protéolytiques de l'APP et production des peptides A β

L'APP peut être clivée par trois complexes protéolytiques appelés α -, β - et γ -sécrétases.

Dans la voie non amyloïdogénique, APP est clivée par l' α -sécrétase et conduit à la libération d'un fragment correspondant au domaine extracellulaire de l'APP (APPs α). Le fragment C-ter (APP-CTF α ou C83) est enchâssé dans la membrane plasmique. Il peut à son tour être clivé par la γ -sécrétase, aboutissant à la formation d'un fragment AICD (APP IntraCellular Domain), et du peptide p3 d'environ 3kD (Figure 14) (Nalivaeva and Turner, 2013; Haass et al., 1993).

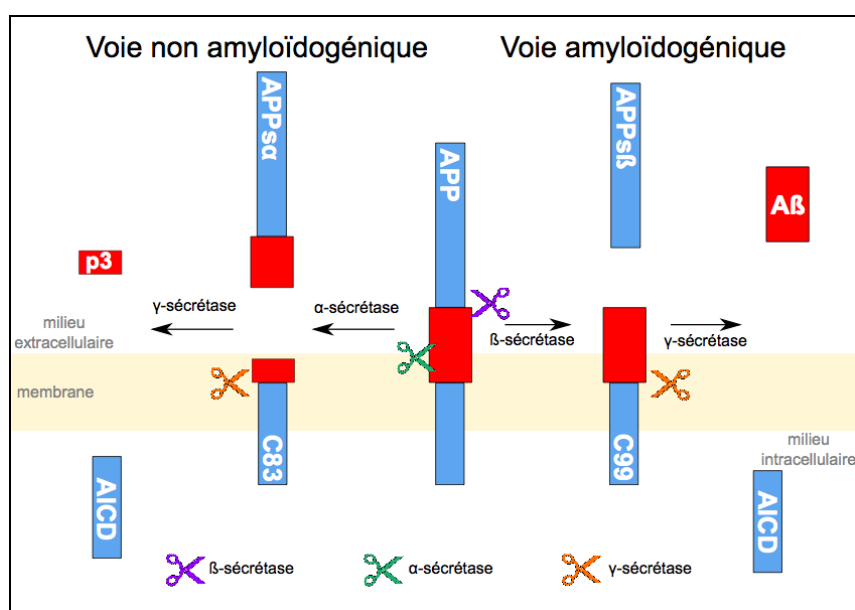


Figure 14 : Protéolyse de l'APP.

Les clivages par les α - et γ -sécrétases dans la voie non amyloïdogénique conduisent à la formation de peptides p3, ceux des β - et γ -sécrétases aboutissent à la libération de peptides A β dans le milieu extracellulaire (d'après Nalivaeva and Turner, 2013).

Dans la voie amyloïdogénique, l'APP est clivée par la β -sécrétase, libérant un fragment soluble APPs β , et laissant le fragment APP-CTF β ou C99 dans la membrane. Suite au clivage par la γ -sécrétase du fragment APP-CTF β , les peptides A β ainsi que les fragments AICD sont libérés (Figure 14).

Dans les conditions saines physiologiques, la voie non amyloïdogénique représente 90% de la protéolyse de l'APP.

II.B.2.a.1. α -sécrétase et APPs α

Le site de clivage de l' α -sécrétase se trouve entre les résidus lysine 16 et leucine 17 d'A β (Figure 15). Plusieurs métallo-endoréptidases membranaires semblent porter cette activité sécrétase, plus particulièrement les membres de la famille des ADAMs (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) ADAM17 (Buxbaum et al., 1998) et ADAM10 (Lammich et al., 1999).

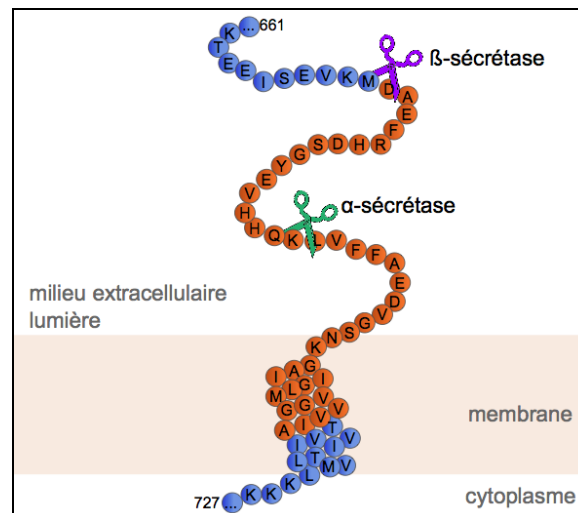


Figure 15 : Sites de clivage des α - et β -sécrétases.

En orange, la séquence correspondant au peptide A β de 42 acides aminés ; en bleu, le reste de la séquence d'APP. Les sites de clivages de l' α -sécrétase (ciseaux verts) et de la β -sécrétase (ciseaux violets) sont indiqués (Modarresi et al., 2011).

L'APP n'est pas le seul substrat de ces protéases, qui sont également impliquées dans le clivage de Notch (Pan and Rubin, 1997; Hartmann et al., 2002), des cadhérines (Maretzky et al., 2005; Reiss et al., 2005), du précurseur membranaire du TNF α (Moss et al., 1997), de HB-EGF (Sahin et al., 2004) ...

Le fragment soluble APPs α relargué présente des propriétés neurotrophiques et neuroprotectives (Caillé et al., 2004; Mattson et al., 1993), cependant les mécanismes impliqués demeurent incompris.

II.B.2.a.2. β -sécrétase et APPs β

La β -sécrétase impliquée dans le clivage de l'APP entre les résidus méthionine 671 et Acide aspartique 672 est la protéase à acide aspartique BACE1 (*β -site APP-Cleaving Enzyme 1*). L'activité BACE1 est présente dans la majorité des cellules et tissus (Haass et al., 1992), mais est particulièrement abondante dans le tissu neural, et plus précisément dans les neurones (Vassar et al., 1999).

D'autres substrats de BACE1 ont été identifiés. La protéolyse de NRG1 (NeuReGulin 1) par BACE1 aurait des implications dans la régulation de la myélinisation (Hu et al., 2006; Willem et al., 2006). Les sous-unités β des canaux sodiques voltage-dépendant sont les substrats de BACE1 et de la γ -sécrétase. Le fragment intracellulaire résultant de ces protéolyses régule l'expression des sous-unités α des mêmes canaux (Kim et al., 2007; Wong et al., 2005). Toutefois, les fonctions physiologiques de BACE1 restent encore largement méconnues.

Le fragment soluble APPs β relargué suite au clivage par la β -sécrétase présente des activités synaptotrophiques et neuroprotectives réduites, voire même abolies, par rapport au fragment APPs α (Li et al., 1997). Ces différences sont difficiles à comprendre car seuls 17 acides aminés diffèrent. Ceci pourrait être dû à un clivage spécifique d'APPs β , permettant sa fixation et l'activation d'un récepteur de la voie de l'apoptose (Nikolaev et al., 2009).

BACE1 est crucial à la formation de peptides A β , il rend le fragment APP-CTF β ou C99 accessible à la γ -sécrétase.

II.B.2.a.3. γ -sécrétase et AICD

La γ -sécrétase est un complexe protéolytique composé de quatre sous-unités essentielles (Edbauer et al., 2003). L'activité catalytique est portée par la sous-unité PS (*Presenilin*). Il existe deux homologues humains : PS1 et PS2. Elles comportent 9 domaines transmembranaires (TMD). La boucle cytoplasmique située entre les TMD6 et TMD7 peut subir un clivage qui stabiliserait la conformation des sites actifs situés dans ces TMD (Wolfe et al., 1999; Edbauer et al., 2003).

Trois autres protéines membranaires composent la γ -sécrétase: NCT, APH-1 (*Anterior PHarynx-defective-1*), et PEN-2 (*Presenilin ENhancer-2*). NCT effectue la reconnaissance des substrats (Shah et al., 2005). Ceci nécessite l'élimination de la plus grande partie du domaine extracellulaire de celui-ci par l'action de l' α ou de la β -sécrétases (Struhl and Adachi, 2000). PEN-2 est requis pour la stabilisation des deux fragments des PS au sein du complexe (Prokop et al., 2004; Hasegawa et al., 2004). La fonction d'APH-1 est floue. Il existe deux homologues humains : APH-1a et APH-1b. APH-1a existe sous deux isoformes issues d'un épissage alternatif. Six complexes coexistent donc chez l'Homme. Les spécificités de ces complexes ne sont pas connues.

Il semble que le clivage par la γ -sécrétase se produise séquentiellement. APP-CTF β subit un premier clivage aux sites ϵ proches de la membrane plasmique (Figure 16). Le long fragment A β enchâssé dans la membrane subit alors une série de clivage pouvant aboutir à des peptides A β de différentes tailles comprises entre 37 et 49 acides aminés (Qi-Takahara et al., 2005). Les peptides majoritaires au sein des plaques sont A β_{40} et A β_{42} .

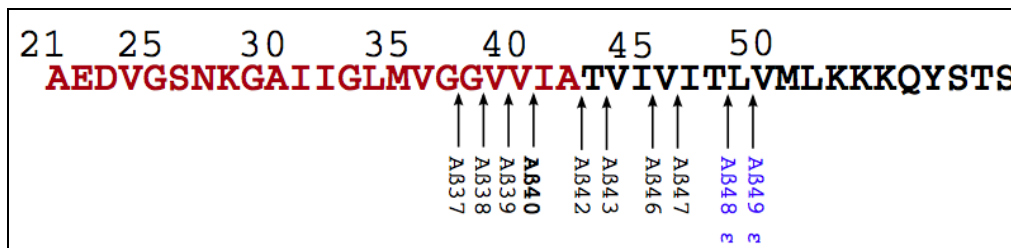


Figure 16 : Sites de clivage de la γ -sécrétase.

En rouge, la fin de la séquence d'Aβ₄₂. Les sites de clivage (flèches) et les peptides Aβ correspondant sont montrés. Aβ₄₀ (en gras) est le peptide majoritairement formé. En bleu sont indiqués les sites ε (d'après (Steiner et al., 2008)).

Le clivage par la γ -sécrétase aboutit à la formation des peptides Aβ, mais aussi à celle du fragment AICD. Ce fragment est très labile, peu présent dans les cellules (Cupers et al., 2001). Il pourrait participer à des mécanismes de signalisation cellulaire. En effet, il serait capable de former un complexe transcriptionnel actif avec Fe65, Tip60 et MED12 (Gao and Pimplikar, 2001; Cao and Südhof, 2001; Xu et al., 2011). Ils réguleraient notamment ainsi l'expression de la neprilysine ou NEP, impliquée dans l'inactivation des événements de signalisation peptidique à la surface des cellules (Huysseune et al., 2009; Pardossi-Piquard et al., 2005). Cependant, ces gènes cibles restent controversés (Chen, and Selkoe, 2007); revue : (Beckett et al., 2012)).

II.B.2.b. Sites de production des peptides Aβ

Les acteurs impliqués dans la production de peptides Aβ (APP et sécrétases) sont des protéines membranaires. Elles font l'objet d'un trafic intracellulaire important. Elles sont adressées au réticulum endoplasmique (RE) sous forme de précurseurs, qui subissent des modifications post-traductionnelles au cours de leur passage dans le RE et l'appareil de Golgi (Golgi).

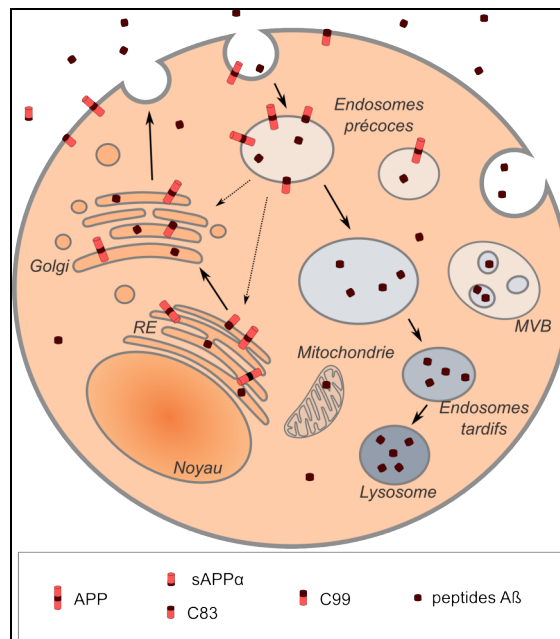


Figure 17 : Sites de production des peptides Aβ.

L'APP est maturé tout au long de la voie de sécrétion, jusqu'à la membrane plasmique. Elle peut être endocytée. À la membrane plasmique, l'APP peut subir l'action de l' α -sécrétase conduisant à la production d'un fragment soluble sAPP α relargué dans le milieu extérieur. La partie C-ter de 83 acides aminés (C83) reste enchâssée dans la membrane. Alternativement, le clivage par la β -sécrétase, au niveau de la voie de sécrétion (RE et Golgi), mais aussi à la membrane plasmique et au niveau endosomal, laisse un fragment de 99 acides aminés dans la membrane (C99). Ce fragment peut être lui-même clivé par la γ -sécrétase (RE, Golgi, membrane plasmique et endosomes) et aboutissant à la libération de peptides A β . Ces peptides sont également retrouvés dans le cytosol et les mitochondries (d'après (LaFerla et al., 2007) et Verduyck et al., soumis)

Une fraction mineure d'APP est située à la membrane plasmique. La majeure partie des APP est localisée dans le Golgi, plus particulièrement le trans-Golgi. On retrouve aussi l'APP dans le RE, les endosomes, les lysosomes et les membranes mitochondriales (Schubert et al., 1991). BACE1 est plutôt retrouvée dans le trans-Golgi et les endosomes (Tesco et al., 2007; Huse et al., 2000). Par ailleurs, son activité est maximale à pH acide, ce qui est le cas dans ces compartiments (Kuentzel et al., 1993). L'activité γ -sécrétase est, quant à elle, détectée dans

différents compartiments : le RE, le Golgi, les endosomes et la membrane plasmique (Xia et al., 1997; Weidemann et al., 1997).

Les peptides A β sont produits à la membrane plasmique, mais aussi tout au long de la voie de sécrétion (Wertkin et al., 1993; Haass et al., 1992). L'internalisation de l'APP par endocytose est également une source importante de production de peptides (Koo and Squazzo, 1994; Koo et al., 1990) (Figure 17).

Les peptides A β sont donc retrouvés à la fois dans le milieu extérieur mais aussi au niveau intracellulaire (Wertkin et al., 1993).

II.C. Étiologie et pathogenèse de la MA

On distingue plusieurs formes de MA en fonction de l'âge d'apparition de la pathologie. 90 % des cas sont des formes de la MA à développement tardif (après 60-65 ans), les 10 % restants sont des formes à développement précoce.

On distingue également les formes héréditaires des formes sporadiques de la MA. Les formes héréditaires concernent 1 % des cas de MA (Revue (Bekris et al., 2010; Bertram et al., 2010)).

II.C.1. Les formes héréditaires de la MA

Toutes les formes héréditaires de la MA sont associées à des mutations modifiant la quantité ou la qualité des peptides A β . Ces mutations sont responsables, la plupart du temps, de formes précoces de la MA.

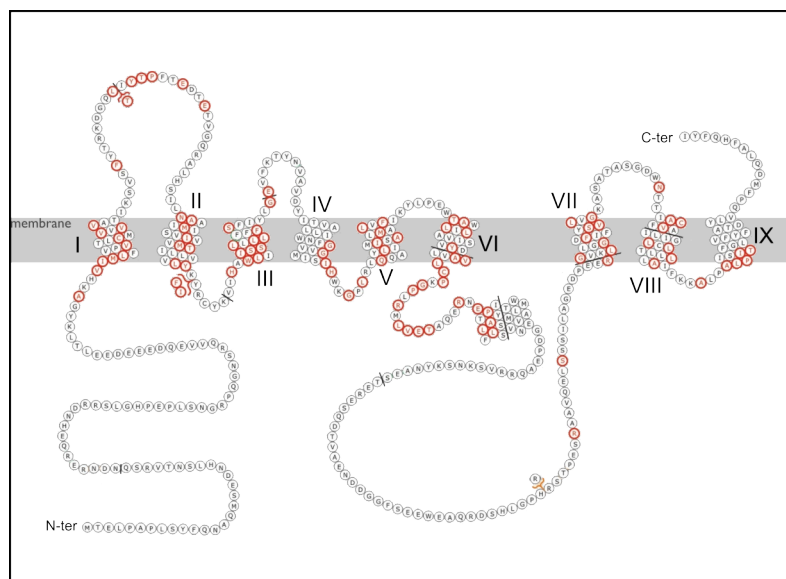


Figure 18 : Les mutations de PS1.

De nombreuses mutations de la PS1 (en rouge) sont associées à des formes familiales de la MA. Les segments transmembranaires sont numérotés (Source : <http://www.molgen.ua.ac.be/admutations>).

On retrouve ainsi des mutations de la γ -sécrétase, particulièrement des sous-unités PS1 et PS2. Les mutations du gène de structure de PS1 (*PSEN1*) sont les plus communes, avec plus de 180 mutations recensées (Figure 18).

Les mutations du gène de structure de PS2 (*PSEN2*) sont plus rares (Figure 19). La plupart de ces mutations sont des mutations faux-sens, entraînant probablement des modifications de l'activité γ -sécrétase, ceci aboutissant à l'augmentation du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ (Scheuner et al., 1996).

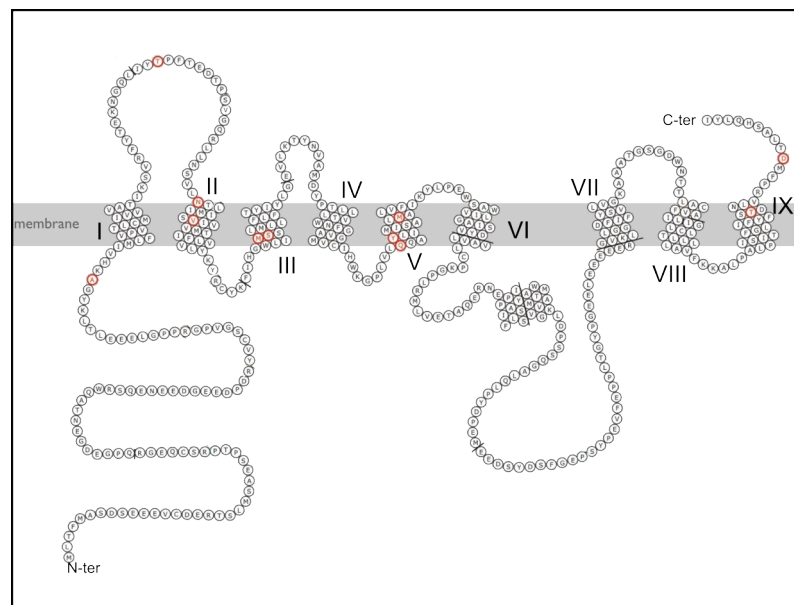


Figure 19 : Les mutations de PS2.

Certaines mutations de PS2 (en rouge) sont associées à des formes familiales de la MA. Les domaines transmembranaires sont numérotés (Source : <http://www.molgen.ua.ac.be/admutations>).

Enfin, des mutations peuvent affecter le gène de structure de l'APP. On recense plus d'une vingtaine de mutations ponctuelles (Figure 20). Ces mutations peuvent toucher la production et/ou la qualité des peptides $A\beta$.

Ainsi, la mutation « Swedish » affecte le site de clivage de la β -sécrétase, et conduit à une augmentation de la quantité d' $A\beta$ (Rabe et al., 2011; Haass et al., 1995; Mullan et al.,

1992). De la même manière, la mutation « Leuven » (E11K) modifie le site alternatif de clivage de BACE1, conduisant là encore à une augmentation de la production de peptides A β (Zhou et al., 2011). La mutation « Flemish », quant à elle, diminuerait l'efficacité de clivage de l' α -sécrétase (De Jonghe et al., 1998; Haass et al., 1994).

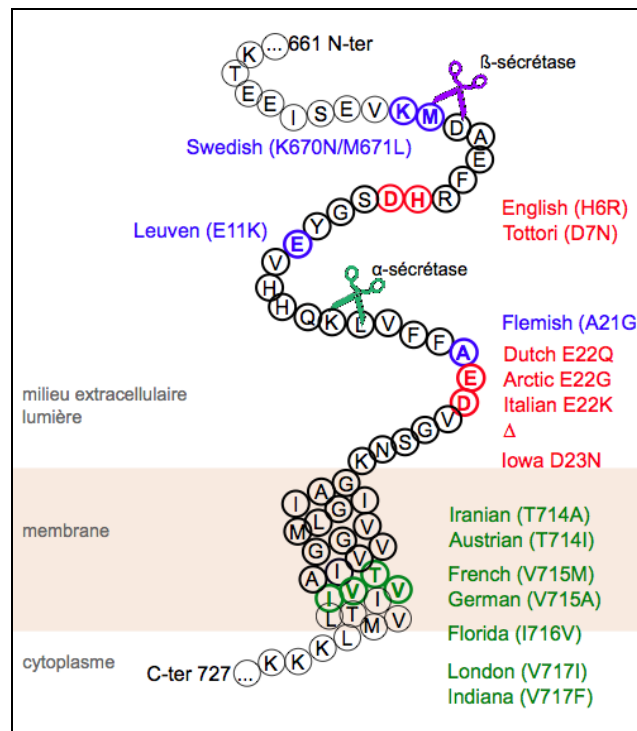


Figure 20 : Les mutations d'APP.

Certaines mutations de l'APP sont responsables de formes familiales de MA. La séquence correspondant à la partie A β de l'APP est indiquée en gras. Des mutations peuvent affecter la quantité de peptides A β produit (en bleu), leurs propriétés d'agrégation (en rouge), ou bien leurs spectres quantitatif et qualitatif (en vert). Des duplications du gène de l'APP et des mutations de la partie 5' UTR de son ARNm peuvent également être responsable de MA (Source : <http://www.molgen.ua.ac.be/admutations>).

D'autres mutations, proches des sites de clivage de la γ -sécrétase (Figure 20, en vert), induisent des modifications du ratio d'A β_{42} /A β_{40} , ou de la quantité de peptides formés (De Jonghe et al., 2001). Ces mutations peuvent aussi affecter les capacités d'agrégation des peptides formés.

Enfin, les dernières mutations concernent la séquence d'Aβ elle-même. Ces mutations (Figure 20, en rouge) conduisent à des modifications des propriétés d'agrégation des peptides, en général les rendant plus prompts à s'agréger ou exacerbant leur capacité à former des oligomères. Nous reviendrons sur ces propriétés d'agrégation dans la partie II.C.4.

D'autres mutations concernent la région régulatrice 5'UTR et des duplications du gène de l'APP (comme dans le cas du syndrome de Down) entraînant une augmentation de la quantité d'APP, et donc une augmentation de peptides Aβ.

Les quelques cas familiaux de la MA sont dus à ces mutations, toutefois, la majorité des cas de MA sont sporadiques. Les causes de ces MA sont peu connues. Il semble qu'ils soient le fruit de facteurs environnementaux, additionné à un contexte génétique favorable. Certains de ces facteurs de risque ont été établis, et sont abordés ci-dessous.

II.C.2. Les facteurs de risque

II.C.2.a. Les gènes de susceptibilité

Plusieurs facteurs de risque génétique lié à la MA ont été identifiés. L'Apolipoprotéine E (ApoE), plus particulièrement l'allèle *APOE* ε4, codant pour l'isoforme ApoE4, est associé à un risque accru de MA (Corder et al., 1993; Pericak-Vance et al., 1991). Les mécanismes impliqués sont mal compris. *In vitro*, l'auto assemblage d'Aβ peut être accéléré par la présence d'ApoE (Ma et al., 1994; Wisniewski et al., 1994; Sanan et al., 1994; Castano et al., 1995). La clairance d'Aβ soluble dans le cerveau est également moins efficace avec l'ApoE4 qu'avec les autres isoformes d'ApoE (Verghese et al., 2013; Castellano et al., 2011). Il semble cependant que cette diminution de clairance ne soit pas due à l'interaction directe entre les lipoprotéines contenant l'ApoE et Aβ (Verghese et al., 2013).

D'autres gènes de susceptibilité ont été mis en lumière. Leurs produits sont impliqués dans différentes voies : l'endocytose ou encore le métabolisme lipidique. La généralisation des approches génomiques globales a permis d'identifier un grand nombre de candidats, dont les mécanismes d'action restent à découvrir. Il s'agit, par exemple, de CLU, PICALM, BIN1 ou encore CR1 (Harold et al., 2009; Lambert et al., 2009; Jun et al., 2010; Bertram and Tanzi, 2009; Logue et al., 2011). Certains variant de l'APP et des PS seraient également des facteurs de prédisposition.

II.C.2.b. Les facteurs environnementaux

Le facteur de risque principal est l'âge. L'incidence de la MA entre 70 et 74 ans est estimée à 2,5 pour 1000 par an, et passe de 27,6 (hommes) à 34,1 (femmes) pour 1000 par an entre 80 et 84 ans. L'aluminium et certains métaux ont également été incriminés. Le tabagisme, l'alcoolisme, les traumatismes crâniens constitueraient aussi des facteurs de risque.

II.C.3. La pathogenèse : l'hypothèse de la cascade amyloïde

L'existence des cas familiaux tous liés à la production de peptides A β ou à leur agrégation a mis ces derniers au centre de la MA. De plus, l'agrégation de la protéine Tau n'est pas exclusive à la MA. Aucune mutation de Tau n'a été décrite comme responsable d'une forme de MA, ou comme facteur de risque de MA. Ceci appuie l'hypothèse selon laquelle les peptides A β sont au cœur de la pathogenèse.

Comme nous l'avons vu précédemment, les plaques amyloïdes et les DNFs sont déconnectées temporellement et leur distribution semble indépendante. Néanmoins, des peptides A β intracellulaires sont détectés avant toute apparition de lésions et de perte neuronale dans les modèles murins (Wirhns et al., 2001; Billings et al., 2005; Oddo et al.,

2003). Ils sont aussi détectés dans les neurones et les cerveaux atteints (Gouras et al., 2000; Nagele et al., 2002; Takahashi et al., 2002). Il semble que l'accumulation de ces formes intracellulaires d'A β soit l'un des événements précoces de la pathogenèse, leur accumulation extracellulaire en plaques amyloïdes ne serait que secondaire.

Les relations entre l'accumulation d'A β et l'agrégation de Tau ne sont pas clairement établies. Il semble que l'accumulation d'A β soit capable d'induire la pathologie Tau (Busciglio et al., 1995; Götz et al., 2001; Lewis et al., 2001; Cohen et al., 2013).

L'ensemble de ces données a donc conduit à mettre A β et son agrégation au cœur de la pathogenèse.

La toxicité des peptides A β , leurs structures et leurs états d'agrégation sont massivement étudiés. L'identification des espèces toxiques d'A β fait l'objet d'études intensives. La multiplicité des espèces d'A β décrites ne dérive pas uniquement des variations natives, mais aussi, et beaucoup, des différentes techniques utilisées pour générer ces espèces *in vitro* ou les purifier *in vivo*.

II.C.4. Agrégation et toxicité d'A β

II.C.4.a. L'agrégation d'A β

Les fibres finales d'A β sont riches en feuillets β , présentent une affinité pour le rouge congo et la ThT et forment souvent des fibres enroulées (Figure 21). Elles sont arrangées en feuillet β parallèle. La toxicité de ces fibres finales semble être réduite par rapport aux espèces formées au cours de l'auto assemblage.

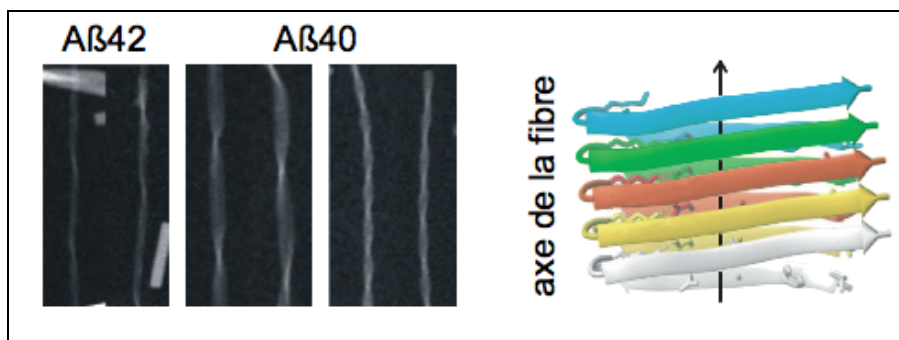


Figure 21 : Fibres d'Aβ.

À gauche, des images de fibres d'Aβ₄₂ (à gauche) et d'Aβ₄₀ (à droite) en microscopie électronique à transmission (Schmidt et al., 2009). À droite, un modèle de fibre d'Aβ₄₂ organisée en feuillets β parallèles (Lührs et al., 2005).

Un soin particulier a été apporté à l'identification des intermédiaires oligomériques formés au cours de l'assemblage. Une difficulté majeure provient du fait qu'*in vivo*, les espèces oligomériques, les intermédiaires d'agrégation, sont en équilibre avec les fibres finales, les monomères etc. *In vitro*, des espèces oligomériques stables peuvent être purifiées, mais leurs effets *in vivo* sont difficiles à évaluer. D'autre part, beaucoup de tests de toxicité différents sont utilisés, rendant les comparaisons peu aisées. Par ailleurs, le SDS est responsable d'une oligomérisation d'Aβ, rendant son étude *in vitro* et son extraction *in vivo* problématique (Rangachari et al., 2006). Enfin, la dernière des difficultés, et non la moindre, réside dans la définition même « d'oligomères ». En effet, « oligomères » désignent des espèces très hétérogènes et polymorphes. Ce terme peut signifier des assemblages multimériques contenant peu de sous-unités (dimères, trimères...) et/ou des agrégats fibrillaires ou non fibrillaires, de relativement petite taille par rapport aux fibres finales, ou de plus grande taille.

Des espèces oligomériques solubles peuvent être extraites de tissus cérébraux atteints. Elles présentent une toxicité accrue et s'agrègent en protofibrilles stables. D'autres espèces sphériques et de plus grandes tailles ont été isolées *ex vivo*. Cependant aucune corrélation

entre présence de ces objets et déclin de la mémoire n'a pu être démontré chez les modèles murins.

De manière générale, *in vivo* l'existence d'un mélange d'espèces solubles d'A β exerçant une neurotoxicité est reconnue, sans avoir pu, jusqu'à présent, y associer une ou des espèces précises.

Concernant les oligomères générés *in vitro*, plusieurs agrégats différents ont déjà été décrits. Du fait du coût et des difficultés de production des peptides A β , des difficultés à contrôler leur état d'agrégation et de monomérisation, beaucoup d'études structurales ont été réalisées sur des fragments d'A β , et non sur A β entier. Ne sont abordés ici que les études réalisées sur A β_{40} et A β_{42} .

Certains auteurs ont suggéré que des formes oligomériques stables d'A β pourraient être des espèces « off-pathway », hors de la voie menant aux fibres finales précédemment évoquées. C'est le cas d'oligomères formés *in vitro* après incubation de monomères d'A β_{42} et d'acides gras non estérifiés. Ces espèces, appelées LFAO et SFAO, pour respectivement *Large Fatty Acid-derived Oligomers* et *Small Fatty Acid-derived Oligomers*, ne forment pas de fibre au cours de la durée des expériences (Figure 22). Ils sont riches en feuillets β . Des expériences d'ensemencement croisé ou « *seeding* » montrent que l'assemblage d'A β n'est pas accéléré par l'ajout de ces oligomères. Ils semblent bien former des oligomères « *off-pathway* » (Kumar et al., 2011; Kumar et al., 2012).

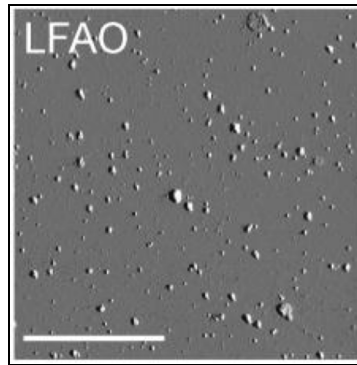


Figure 22 : LFAO en Microscopie à Force Atomique (AFM).

Les LFAO sont formés par l'incubation de monomères d'A β et d'acides gras non estérifiés.

L'échelle représente 2,5 μ m (d'après Kumar et al, 2012).

Des oligomères globulaires, appelés globulomères, sont formés par l'incubation d'A β 42 et de SDS. Ils ne fixent ni le rouge congo ni la ThT. Ils ne sont pas capables de provoquer l'agrégation de monomères d'A β dans des expériences de « *seeding* », et ne peuvent pas s'assembler en fibrilles amyloïdes. Ces globulomères constitueraient également des oligomères « off-pathway » (Barghorn et al., 2005; Gellermann et al., 2008).

Des « protofibrilles » ont été décrits comme des intermédiaires stables formés au cours de la fibrillogénèse (Figure 23), qui sont capables de former à la fois des fibrilles finales et des espèces de plus petit poids moléculaire. Elles sont arrangées en feuillet β parallèles. Elles sont responsables d'une toxicité chez la souris et sur des cellules en culture.

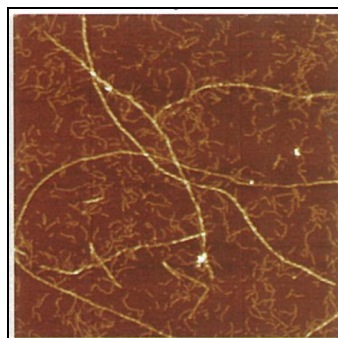


Figure 23 : Fibrilles et protofibrilles d'A β .

Les protofibrilles sont des intermédiaires stables. Ils sont observés ici après 7 jours d'incubation d'A β ₄₀, en AFM (Harper et al., 1997).

Des structures protofibrillaires annulaires ont également été mises en évidence, formée à l'interface hexane-eau (Kayed et al., 2009) (Figure 24). Leur structure n'est pas connue, mais elles seraient responsables d'une perméabilisation membranaire.

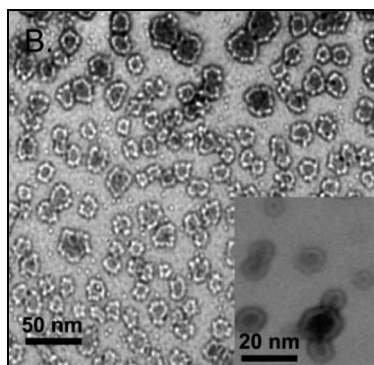


Figure 24 : Des protofibrilles annulaires.

Les protofibrilles annulaires d'A β ₄₂ formés à l'interface hexane-eau, sont observés en microscopie électronique à transmission (Kayed et al., 2009).

Des structures globulaires, appelées ADDL (*A β -derived diffusible ligands*) sont formés par l'incubation d'A β ₄₂ dans des milieux de cultures ou avec la clusterine. Ces ADDLs induisent une toxicité sur des cellules de coupes de cerveaux de souris (Lambert et al., 1998) et sur des cellules en culture (Dahlgren et al., 2002). Ils sont détectés dans des extraits de cerveaux atteints (Gong et al., 2003). Ils seraient responsables d'une perturbation du transport axonal des mitochondries (Wang et al., 2010). Les ADDLs présentent un agencement en feuillets β anti-parallèles (Cerf et al., 2009). Le mutant Iowa, A β ₄₀ D23N, est également capable de former des fibrilles riches en feuillet β antiparallèle ainsi que des fibres β parallèle. Leur toxicité sur des cellules en culture est cependant comparable (Qiang et al., 2012).

L'agrégation d'autres mutants familiaux d'A β a aussi été étudiée. Le mutant Dutch A β E22Q et le mutant Italian E22K présentent une agrégation accélérée par rapport à A β ₄₂ wt (Sian et al., 2000; Murakami et al., 2002). Ils sont, avec le mutant Arctic E22G, dix fois plus

toxiques qu'A β wt sur des cellules en culture (Murakami et al., 2002). Le mutant Arctic E22G forme également plus de protofibrilles qu'A β wt (Nilsberth et al., 2001; Johansson et al., 2006) ; contrairement aux mutants Tottori D7N et English H6R dont l'agrégation est accélérée, mais dont la production de protofibrilles n'est pas augmentée (Hori et al., 2007). Les oligomères formés par ces mutants Tottori et English sont plus toxiques sur des cellules en culture que ceux d'A β wt (Ono et al., 2010).

Qu'elles soient basées sur des peptides A β synthétiques, des peptides contenus dans des milieux cellulaires, dans des modèles murins ou même purifiés *ex vivo* à partir de cerveaux atteints, les études montrent avant tout que l'agrégation et les mécanismes de toxicité des peptides A β sont extrêmement complexes, et leurs descriptions particulièrement malaisées.

II.C.4.b. Les multiples mécanismes de toxicité d'A β

Les études des mécanismes de toxicité liés à A β ont permis de mettre en lumière des processus qui pourraient être impliqués dans la pathogenèse.

A β induit une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Mattson et al., 1992; Mattson et al., 1993). Des fibroblastes de patients MA présentent une mobilisation différente du calcium des fibroblastes sains (Gasparini et al., 1998). Des oligomères d'A β , contrairement aux monomères ou aux fibres matures, induisent une entrée massive de calcium dans les cellules en culture (Demuro et al., 2005). L'homéostasie calcique est particulièrement importante dans les neurones où elle influence la morphologie et le nombre de synapses et de ramifications (Kato-Negishi et al., 2003). Enfin, un déséquilibre de l'homéostasie calcique pourrait provoquer un déséquilibre kinase-phosphatase pouvant aboutir à la phosphorylation

de Tau, et, *in fine*, aux DNFs (Fleming and Johnson, 1995). Ce déséquilibre calcique pourrait avoir plusieurs origines : l'activation de récepteurs calciques par A β , *via* son interaction avec des récepteurs tels que le récepteur à NMDA ou l' α 7nAChR (Parri and Dineley, 2010; Alberdi et al., 2010), une altération de l'intégrité membranaire par A β (McLaurin and Chakrabartty, 1996; Blanc et al., 1997) ou encore une altération de l'intégrité membranaire par la création de pores composés d'A β , permettant le passage de calcium (Arispe et al., 1993; Arispe et al., 1993; Rhee et al., 1998; Inoue, 2008).

Le protéasome constitue une cible d'A β . Ceci a été démontré dans des cellules érythropoïétiques (Gregori et al., 1995), des cellules neuronales de rat et chez un modèle murin d'A β exprimant le mutant Swedish d'APP (Oh et al., 2005).

L'autophagie est aussi impliquée. L'accumulation anormale d'autophagosomes et de vacuoles autophagiques est observée sur des coupes de cerveaux atteints (Nixon et al., 2005). Des défauts de maturation de ces vacuoles sont décrits, suggérant des dysfonctions dans le recyclage des protéines contrôlées par l'autophagie. Cette accumulation est retrouvée dans des modèles murins, dont les cellules développent précocement une macroautophagie, pouvant conduire à l'apoptose (Yu et al., 2005; Bursch, 2001).

Par ailleurs, l'activation de la voie apoptotique a été impliquée dans la toxicité d'A β . Les neurones en culture traités aux peptides A β présentent des morphologies de cellules apoptotiques (Loo et al., 1993). L'homologue de la caspase 3, initiateur de l'apoptose, est activée dans des modèles murins de la MA (Harada and Sugimoto, 1999). L'activation de l'apoptose pourrait aussi impliquer le facteur proapoptotique p53. Lors d'un stress oxydant, A β est localisé au noyau et une augmentation de l'expression de p53 est détectée, celle-ci pouvant conduire à l'apoptose (Ohyaï et al., 2005).

A β provoque aussi une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *Reactive Oxygen Species*) intracellulaires (Manczak et al., 2006). Les ROS peuvent provoquer

l'oxydation de l'ADN et des protéines, la peroxydation de lipides, ou encore l'inactivation de certaines enzymes par oxydation de leurs co-facteurs. Cette surproduction de ROS pourrait être due à des dysfonctionnements mitochondriaux. Le lien entre peptide A β et mitochondrie est également renforcé par leur détection dans ce compartiment (Devi et al., 2006; Hansson Petersen et al., 2008; Du et al., 2008; Tillement et al., 2011), où ils peuvent interagir avec plusieurs protéines. Un des candidats est ABAD, une enzyme réduisant les aldéhydes et les cétones et oxydant les alcools, et qui pourrait ainsi provoquer un « relarguage » des ROS (Lustbader et al., 2004). Chez la souris, A β induit des altérations de la biogenèse mitochondriale et de leur transport axonal (Calkins et al., 2011). L'expression d'APP entraîne aussi des diminutions des activités des complexes III et IV de la chaîne respiratoire (Manczak et al., 2006). En effet, A β est capable de se lier à la sous unité 1 de la cytochrome C oxydase (Hernandez-Zimbron et al., 2012).

Les mécanismes de toxicité des peptides A β , bien que de nombreuses pistes aient été mises à jour, ne sont pas entièrement compris. Les peptides A β perturbent de nombreux processus cellulaires, qui sont eux-mêmes interconnectés et complexes. La « séquence pathogénique », c'est-à-dire l'enchaînement des événements aboutissant à la pathologie et leurs interactions, est méconnue et délicate à établir. Ce type d'étude est bien souvent facilité par l'existence de modèles simplifiés, permettant d'accéder à des réponses ciblées. Ces modèles sont abordés ci-dessous.

III. Les modèles d'étude de la MA

III.A. A β et *Rattus norvegicus*

Le rat constitue un modèle de choix de la MA, par sa distance évolutive réduite, par rapport à celle de la souris, à l'Homme. Son cerveau est de plus grande taille que celui de la souris, et son intelligence permet des études comportementales poussées.

Un modèle d'accumulation d'A β extracellulaire a été mis en place par l'expression d'un APP humain muté (Swedish (K670N/M671L) et Indiana (V717F)) et de la PS1 (M146V). Des dépôts amyloïdes sont décrits à partir de l'âge de 9 mois (Flood et al., 2009), et dès 7 mois, les rats présentent des déficits de la potentialisation à long terme (LTP) indicateur de la plasticité synaptique. Les rats présentent à partir de 7 mois des défauts d'apprentissage et de mémoire, qui semblent être corrélés aux quantités d'A β_{42} dans l'hippocampe (Liu et al., 2008).

L'expression d'APP Swedish et du mutant humain délété de l'exon 9 de la PS1 entraînent des perturbations progressives et dépendantes de l'âge de la mémoire et de l'apprentissage spatial. Une augmentation progressive des dépôts d'A β , une accumulation d'A β_{42} intracellulaire, et d'oligomères solubles sont également détectés. Les rats développent une tauopathie associée à une agrégation et une hyperphosphorylation de Tau. Enfin ce modèle manifeste une neuroinflammation, une perte neuronale et une neurodégénérescence comparable à la situation pathologique humaine (Cohen et al., 2013). Ce modèle montre qu'une abondance d'APP et A β peuvent être à l'origine des autres lésions observées dans la MA, appuyant ainsi l'hypothèse amyloïde abordée plus haut.

III.B. Les modèles murins de la MA

Il existe une dizaine de modèles transgéniques de souris développés pour l'étude d'A β . *Mus musculus* possède un homologue de l'APP. Ces modèles sont donc basés sur l'expression de l'APP humain (APP_h), sauvage ou muté. L'existence d'homologues des sécrétases permet la production de peptides A β à partir d'APP_h. Ces modèles sont récapitulés ci-dessous (Tableau 2). Ces modèles ont permis de caractériser la localisation et la toxicité des peptides A β qui sont abordés tout au long de cette introduction.

Nom	Transgène et mutations	Promoteur	Plaques amyloïdes	NFTs	Pertes neuronales	Déficits cognitifs
PDAPP	App695, 751, 770 APP Indiana	PDGF- β	6-9 mois	Non	Non	Oui
Tg2576	APP695 APP Swedish	PrP hamster	9 mois	Non	Non	Oui
APP23	APP751 APP Swedish	Thy-1	6 mois	Non	14 mois	Oui
J20	APP695, 751, 770 APP Swedish, Indiana	PDGF- β	6 mois	Non	Non	Oui
TgCRND8	APP695 APP Swedish, Indiana	Prp hamster	3 mois	Non	Non	Oui
mThy1-hAPP751	APP695 APP Swedish, Indiana	Thy-1	3-4 mois	Non	Non	Oui
APPDutch	APP751 APP Dutch	Thy-1	22 mois	Non	Non rapporté	Non rapporté
ARC6,ARC48	App695, 751, 770 APP Swedish, Indiana, Arctic	PDGF- β	2-3 mois	Non	Non	Oui et non
PSAPP	Tg2576 x PSEN-1 M146L	PrP hamster PDGF- β	6 mois	Non	Non	Oui
5XFAD	APP695 Swedish, London, Florida PSEN-1 M146L, L286V	Thy-1	2 mois	Non	9 mois	Oui
TAPP	Tg2576 x 4R0N MAPT (Tau-P301L)	PrP souris	9 mois	9 mois	6,5 mois	Oui
3XTG	APP695 Swedish 4R0N MsAPT (P301L) PSEN-1 M146V (Knock-in)	Thy-1 Thy-1	6 mois	12 mois	Non	Oui

Tableau 2 : Les principaux modèles murins de la MA.

Les souris Tg2576 sont les plus utilisées pour l'étude de la MA. Les neurones de ces souris expriment le mutant Swedish d'APP. C'est dans ce modèle que des formes oligomériques appelées « A β *56 » ont été identifiées (Lesné et al., 2006).

Dans la plupart des modèles murins, Tau est hyperphosphorylée, mais aucune lésion de type DNF n'est observée. La coexpression de variant d'APP et de mutant de Tau associé à

des tauopathies est nécessaire à la présence des deux types de lésions caractéristiques de la MA, comme dans le cas des souris 3xTG.

L'utilisation du mutant Arctic d'A β (E22G) dans les modèles ARC6 et ARC28 a permis de mettre en évidence une vitesse d'agrégation accrue, se traduisant par des effets neurotoxiques plus importants (Nilsberth et al., 2001; Lashuel et al., 2003).

Bien que ces modèles aient permis des avancées considérables dans la compréhension de l'agrégation et de la toxicité d'A β , ils sont difficiles d'accès pour des approches cellulaires et moléculaires, leur puissance résultant des aspects physiopathologiques.

III.C. A β chez *Drosophila melanogaster*

Deux principaux modèles sont utilisés pour étudier la biologie du peptide A β chez la Drosophile. Elle possède un homologue d'APP (dAPPL) présentant 30% d'identité avec l'APP humain, mais qui ne présente pas la séquence A β . La délétion du gène de structure de cet homologue entraîne des troubles du phototactisme, troubles partiellement supprimés par l'expression de l'isoforme APP695 humain (Luo et al., 1992). La surexpression de dBACE, un homologue de BACE-1 humain, et de dAPPL conduit à la surproduction d'un peptide correspondant à la région A β . Ce clivage implique également le clivage par un complexe γ -sécrétase (Takasugi et al., 2003). Le peptide ainsi produit s'accumule sous forme de fibrilles intracellulaires et de dépôts amyloïdes. Une neurodégénération et des troubles comportementaux apparaissent avant l'observation des dépôts amyloïdes (Carmine-Simmen et al., 2009).

La coexpression d'APP^h et BACE1 associée à la surexpression de l'homologue de PS1 *dPsn* entraîne la production de peptide A β ₄₀ et A β ₄₂, ainsi que celle des fragments intracellulaires d'APP. Dans l'œil, cette combinaison entraîne une dégénérescence des tissus oculaires (Greeve et al., 2004). Lorsque la surexpression est ubiquitaire, les drosophiles

présentent une perte de viabilité. La transposition de mutation de PS1 responsable de formes familiales de la MA dans *dPsn* amplifie ces phénotypes.

L'expression d'A β ₄₀ ou A β ₄₂ dans les tissus neuronaux, adressé à la voie de sécrétion par l'ajout d'une séquence signal entraîne une accumulation dans le cerveau, et une dégradation des capacités mémorielles à court terme. A β ₄₂ seul forme des dépôts amyloïdes et une toxicité dans le tissu dans lequel il est exprimé, ou une létalité lorsque son expression est ubiquitaire (Iijima et al., 2004; Finelli et al., 2004).

L'étude du mutant Arctic (Arc E22G) dans ces conditions a montré que son expression induit des dysfonctionnements neuronaux et locomoteurs ainsi qu'une neurodégénération exacerbée par rapport à A β sauvage. A β ₄₂ Arc forme aussi plus d'oligomères et de dépôts amyloïdes. La sévérité des dysfonctionnements moteurs semble être intimement liée aux propriétés d'agrégation d'A β . En fonction de l'allèle d'A β exprimé, les pathologies développées sont qualitativement différentes (Crowther et al., 2005).

Les modèles de drosophiles ont permis d'étudier certaines molécules d'intérêt thérapeutique et leurs effets. C'est le cas de la néprilysine, endopeptidase impliquée dans la dégradation des peptides A β . Chez la drosophile, la néprilysine réduit la quantité d'A β ₄₂ dans les fractions solubles et insolubles issues de cerveaux, prévient la formation de dépôts amyloïdes et supprime les pertes neuronales. Cependant, son expression réduit considérablement la durée de vie des mouches et provoque une dégénérescence axonale (Iijima-Ando et al., 2008). Ces effets sont très probablement liés à son action sur un facteur important pour la survie neuronale et la mémoire, le facteur de transcription CREB (cAMP Response Element-Binding).

Les modèles de Drosophiles de la MA ont permis des avancées sur l'analyse de la toxicité d'A β mais aussi sur l'étude de pistes thérapeutiques et l'évaluation de leurs risques potentiels.

III.D.Études d'A β chez *Caenorhabditis elegans*

Le nématode possède un homologue de l'APP : APL-1, qui ne contient pas de séquence homologue à A β (Daigle and Li, 1993). Cette protéine est essentielle au développement larvaire puisque sa délétion induit une létalité complète aux stades précoces de développement, et que la survie est restaurée par la réintroduction du gène de structure d'APL-1. Sa surexpression entraîne aussi des défauts de fertilité, viabilité et mobilité, directement reliés au niveau d'expression d'APL-1. Un rôle dans l'adhésion intercellulaire est proposé pour cette protéine (Hornsten et al., 2007).

Une activité γ -sécrétase a pu être détecté chez *C.elegans*, associée à un complexe formé de SEL-12 (Levitan and Greenwald, 1995), HOP-1 (Li and Greenwald, 1997) et SPE-4 (Arduengo et al., 1998) comme homologues des PS, et d'autres homologues de la nitrastrine, APH-1 et PEN-2 (Francis et al., 2002). Cependant, aucune activité β -sécrétase n'a pu être identifié.

L'expression d'A β fusionné à une séquence d'adressage à la voie de sécrétion dans des cellules musculaires provoque une paralysie progressive et une accumulation en dépôts amyloïdes intracytoplasmiques (Link, 1995; Link et al., 2001). Dans ce modèle, la maturation de la construction conduit non pas à la libération d'un peptide A β ₁₋₄₂ mais d'une forme plus courte A β ₃₋₄₂. Cette forme s'avère plus prompte à catalyser l'agrégation d'A β ₄₀ qu'A β ₄₂ (McColl et al., 2009). La présence d'agrégats intracytoplasmiques pourrait être due à la rétrotranslocation du peptide venant du RE après l'activation du système contrôle qualité, ou

bien encore à la séquestration d'Aβ dans des vésicules autophagiques. En effet, des vésicules autophagiques immatures ont tendance à s'accumuler dans ce modèle. Le blocage de l'autophagie ne réduit ni la quantité de peptides, ni la paralysie des vers. Ce modèle ne permet pas de déterminer si la toxicité résulte des dépôts ou de la perturbation du fonctionnement cellulaire lié à la surexpression d'Aβ.

Un modèle permettant une expression inductible a donc été créé, dans lequel l'expression d'Aβ induit une oxydation des protéines préalablement à la formation des dépôts extracellulaires (Link et al., 2003; Drake et al., 2003; Yatin et al., 1999). Un mutant Aβ_{M35C}, qui ne permet pas la formation de structures amyloïdes chez le nématode, n'induit pas non plus de stress oxydatif mesuré par la carbonylation des protéines (Fay et al., 1998). Ce modèle a permis de tester les effets d'anti-oxydant sur la toxicité associée à Aβ. L'EGB761 (Smith and Luo, 2003; Wu et al., 2006) et la glycitéine (Gutierrez-Zepeda et al., 2005) diminuent l'oxydation des protéines et la quantité des dépôts, sans que ces effets soient compris.

Ce modèle inductible a également permis l'étude des variations d'expression géniques en présence d'Aβ. Parmi les 67 gènes surexprimés dans ces conditions, deux d'entre eux, F22E5.6 et HSP16, possèdent des homologues humains : *TNFAIP1* (Tumor Necrosis Factor α-Induced Protein) et *CRYAB* (codant pour l'αB cristalline, famille des Heat-Shock Protein HSP) respectivement. Ces deux gènes sont également surexprimés dans le cerveau de patients décédés de MA (Link et al., 2003).

Plusieurs interactions entre Aβ₄₂ et des HSP ont été identifiées chez le ver. Deux protéines de la famille des HSP70 et l'un de ses régulateurs négatifs putatifs, 3R05F9.10, dont l'extinction diminue la paralysie des nématodes, sont capables d'interagir avec Aβ₄₂ et module sa toxicité (Fonte et al., 2002; Fonte et al., 2008).

Les modèles de la MA dans le nématode ont donc permis des avancées dans la compréhension de la toxicité du peptide A β et dans la description d'effets de potentielles molécules thérapeutiques.

III.E. Études d'A β chez *Saccharomyces cerevisiae*

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un organisme modèle unicellulaire eucaryote qui a déjà permis, avec succès, l'étude de mécanismes fondamentaux à l'origine de maladies neurodégénératives. Elle est aussi utilisée pour l'étude de la maturation de l'APP, l'agrégation d'A β et sa toxicité.

La levure ne possède pas d'homologues d'APP, ni de BACE1, ni du complexe γ -sécrétase. Les études de la protéolyse de l'APP, exprimée dans la voie de sécrétion par sa fusion à la séquence signal du facteur alpha, ont montrées le relargage d'une partie N-ter dans le milieu et la rétention du fragment C-ter dans la membrane plasmique d'une taille similaire au fragment C89 (Zhang et al., 1994). Les enzymes responsables de ce clivage, similaire à celui de l' α -sécrétase, au niveau trans-golgien sont les protéases Yap3 et Mkc7 (Zhang et al., 1997).

Des modèles des activités β - et γ -sécrétases ont été créés dans la levure. Le premier modèle permet l'expression d'une protéine de fusion comprenant un fragment d'APP contenant le site β , le domaine transmembranaire et la partie C-ter fusionné à l'invertase. L'invertase est nécessaire à la croissance en milieu saccharose. Cet ancrage à la membrane la rend inactive, les cellules exprimant cette construction ne peuvent donc croître en milieu saccharose. L'expression de BACE1 humain dans ces levures permet le clivage de la protéine de fusion et la libération de l'invertase. Les cellules croissent alors en milieu saccharose. Ce modèle permet le criblage d'inhibiteurs de l'activité β -sécrétase (Middendorp et al., 2004).

L'activité γ -sécrétase a aussi été reconstituée dans la levure. La coexpression de PS1, Aph-1, Pen2, nicastrine et d'APP fusionné au rapporteur GAL4 permet la libération de ce dernier et l'activation de la transcription du gène rapporteur (Edbauer et al., 2003).

L'implication du protéasome dans la dégradation d'espèces promptes à s'agréger a été mise en évidence grâce à l'expression du fragment C99 adressé à la voie de sécrétion (Sparvero et al., 2007).

Des fusions d'Aβ avec la partie C-ter de Sup35, dépourvus de son domaine prion, ont permis de mettre en place un test d'oligomérisation d'Aβ performant (voir la partie 0 pour Sup35p). Cette protéine de fusion est exprimée dans des levures possédant un allèle *adel-14*, codant pour une protéine inactivée par la présence d'un codon stop prématuré, rendant les cellules [ADE-]. L'agrégation d'Aβ permet la translecture du codon stop et les levures deviennent [ADE+]. Ce système fournit un test d'agrégation d'Aβ robuste et a permis de mettre en évidence des mutations inhibant son auto assemblage. L'agrégation d'Aβ dans la levure est dépendante de la chaperone cytoplasmique Hsp104 (Bagriantsev and Liebman, 2006).

Enfin, un modèle de la toxicité d'Aβ dans lequel Aβ₄₂ fusionné à la séquence signal de Kar2 permettant son entrée dans le RE a été créé. Aβ dans ce cas n'est pas retrouvé dans le milieu, mais serait retenu dans l'espace périplasmique où il pourrait interagir avec la membrane plasmique et être endocyté. Les cellules exprimant ces constructions, intégrées au génome, présentent un défaut de croissance. Dans les mêmes conditions, Aβ₄₀ s'avère moins toxique qu'Aβ₄₂. Ainsi, le défaut de croissance étant suffisant, un crible génétique a pu être entrepris. 12 gènes modulent la toxicité d'Aβ dans la levure, dont l'un des homologues de PICALM, déjà décrit comme prédisposant à la MA, YAP1802 (voir la partie II.C.2.a.). L'implication de l'endocytose dépendante de la clathrine comme point critique de la toxicité d'Aβ a été confirmée dans le nématode, et des neurones corticaux de rat (Treusch et al., 2011).

IV. Les objectifs de thèse

Le laboratoire Analyse Fonctionnelle des Amyloïdes a longtemps étudié les prions de levure et leur transmissibilité. L'existence d'amyloïdes non toxiques et d'amyloïdes toxiques partageant des structures et intermédiaires d'assemblage communs soulève une question majeure à laquelle s'est attaché le laboratoire : qu'est-ce qui différencie un amyloïde toxique d'un amyloïde non toxique? La toxicité est-elle portée par des intermédiaires n'existant pas chez les amyloïdes non-toxiques ou les espèces sont-elles les mêmes, et seules varient les cinétiques et donc les quantités d'espèces toxiques ? Quels sont les mécanismes moléculaires de cette toxicité ?

Mon travail de thèse s'est intégré dans cette problématique générale. Dans un premier temps, j'ai participé au travail de thèse de Fabien D'Angelo qui s'intéressait au développement et à la caractérisation d'un modèle d'étude de la toxicité d'A β dans la levure. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue *Disease Models and Mechanisms* et est présenté en première partie des résultats (cf. Résultats I.B).

Grâce à ce modèle, j'ai pu m'intéresser aux relations structure-toxicité du peptide A β ₄₂ en créant des variants à la toxicité exacerbée ou au contraire non toxiques dans la levure. Ces variants ont été étudiés *in vitro* afin de tenter d'établir les différences biochimiques ou d'assemblage corrélés à la toxicité établie *in vivo*. Ce travail a permis de mettre en évidence une capacité spécifique des variants toxiques d'A β à former des oligomères capables de s'assembler en structures riches en feuillet β antiparallèles. Ces études sont à l'origine d'une soumission d'article dans la revue PLOS ONE, et sont présentées dans la deuxième partie des résultats (cf. Résultats II.B).

Enfin, la création d'allèle hyper toxique d'A β ₄₂ dans la levure a permis la réalisation de cribles génétiques afin d'établir les éléments modulant la toxicité d'A β ₄₂ *in vivo*. Les résultats de ces cribles sont présentés dans la troisième et dernière partie de ce manuscrit.

RÉSULTATS

I. Création et caractérisation d'un modèle d'étude de la toxicité d'A β ₄₂ dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*

I.A. Introduction

Au cours de mon doctorat, j'ai pu participer au le projet de thèse de Fabien D'Angelo qui consistait en l'élaboration d'un modèle d'étude dans la levure de la toxicité d'A β ₄₂. En effet, aucun modèle de toxicité n'avait encore été établi dans la levure. Plusieurs études ont montré la capacité d'A β à s'agréger dans la levure lors de sa fusion à la GFP ou au domaine C-ter de Sup35p (Bagriantsev and Liebman, 2006; Caine et al., 2007). Le faible ralentissement de croissance induit par l'expression de la fusion GFP-A β (de l'ordre de 5%) n'est pas suffisant pour l'établissement d'un modèle de toxicité d'A β qui permettrait des investigations plus larges. La création d'un modèle permettant ces études a donc été amorcée au laboratoire par F. D'Angelo.

F. D'Angelo a construit des plasmides d'expression d'A β ₄₂ wt et arc, fusionné à la GFP et sous le contrôle du promoteur inductible par le galactose GAL10. Les constructions dont l'expression est induite par le galactose sont alors cytoplasmiques et les levures ne présentent pas de défaut de croissance (Figure 25). L'ajout d'une séquence d'adressage à la voie de sécrétion, la séquence pré-pro du facteur alpha, a alors permis de mettre en évidence la toxicité des constructions. De plus, l'expression de la construction portant la mutation arc induit un défaut de croissance sensiblement supérieur à celui d'A β wt. Ce modèle mime donc la toxicité allèle-dépendante observée chez l'Homme.

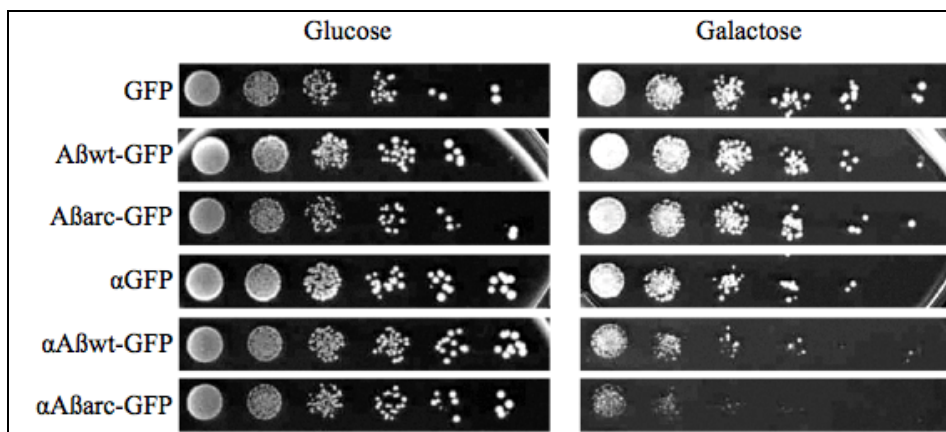


Figure 25 : Mise en évidence de la toxicité des constructions $\alpha A\beta_{wt}$ GFP et $\alpha A\beta_{arc}$ GFP.

Test en gouttes ou test en dilutions séries de levures sauvages transformées par les vecteurs d'expression des constructions indiquées. Sur milieu non inducteur glucose, la croissance des levures exprimant les différentes constructions est comparable. En milieu inducteur galactose, les levures exprimant les constructions $A\beta_{wt}$ GFP et $A\beta_{arc}$ GFP ne présente pas de défaut de croissance par rapport aux levures exprimant la GFP seule. Les levures exprimant les constructions $\alpha A\beta_{wt}$ GFP et $\alpha A\beta_{arc}$ GFP présentent un défaut de croissance, défaut plus important encore pour $\alpha A\beta_{arc}$ GFP.

La suite de son travail de thèse a porté sur la caractérisation du modèle et de la toxicité cellulaire d' $A\beta$ dans la levure. Il a pu montrer que la construction était correctement adressée à la voie de sécrétion. Le peptide signal du facteur alpha est clivé lors de sa translocation dans le RE. La séquence pro est alors glycosylée dans le RE puis le Golgi, et est clivée dans le trans-golgi par Kex2. $A\beta$ -GFP résultant de ce clivage n'est cependant pas retrouvé dans le milieu extracellulaire.

La caractérisation de la localisation subcellulaire d' $A\beta$ a conduit à la création de nouveaux vecteurs d'expression d' $\alpha A\beta$ -GFP. En effet, lors de l'expression d' $\alpha A\beta$ -GFP, aucune fluorescence de la GFP n'a pu être détectée. Il semble que la fusion d' $A\beta$ à la GFP empêche le repliement natif de cette dernière. L'ajout d'un doublet (Gly-Ala) répété trois fois entre $A\beta$ et la GFP a permis de remédier à ce problème.

Les constructions d' α A β -I-GFP présentent un profil de fluorescence en anneau périnucléaire caractéristique du RE, associé à une fluorescence ponctiforme pouvant correspondre à des vésicules. Par ailleurs, les agrégats formés dans le cytoplasme sont différents de ceux formés par le passage dans la voie de sécrétion, pouvant expliquer leur différence de toxicité.

L'étude de différents mutants du trafic vésiculaire à laquelle j'ai participé a permis de mettre en exergue le rôle de l'endocytose dans la toxicité. Il semble que les organites situés dans la voie endocytique, comme les endosomes et la vacuole, soient des lieux importants pour l'expression de la toxicité d'A β . Le rôle de PICALM (facteur de prédisposition à la MA abordé dans la partie II.C.2.a) et de ses homologues dans la toxicité d'A β a pu également être mis en évidence.

Enfin, les effets de l'expression d'A β sur les mitochondries ont pu être analysés. A β est responsable d'une diminution de la consommation d'oxygène, mettant en évidence un effet potentiellement délétère d'A β sur le métabolisme énergétique des levures.

I.B. Article 1 : « a yeast model for Amyloid- β aggregation exemplifies the role of membrane trafficking and PICALM in cytotoxicity »

A yeast model for amyloid- β aggregation exemplifies the role of membrane trafficking and PICALM in cytotoxicity

Fabien D'Angelo^{1,*}, H       Vignaud^{1,*}, Julie Di Martino¹, B         Salin¹, Anne Devin¹, Christophe Cullin^{1,  } and Christelle Marchal¹

SUMMARY

Alzheimer's disease is the most common neurodegenerative disease, associated with aggregation of amyloid- β (A β) peptides. The exact mechanism of neuronal cell dysfunction in Alzheimer's disease is poorly understood and numerous models have been used to decipher the mechanisms leading to cellular death. Yeast cells might be a good model to understand the intracellular toxicity triggered by A β peptides. Indeed, yeast has been used as a model to examine protein functions or cellular pathways that mediate the secretion, aggregation and subsequent toxicity of proteins associated with human neurodegenerative disorders. In the present study, we use the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study the effects of intracellular A β in fusion with green fluorescent protein. We sent this fusion protein into the secretory pathway and showed that intracellular traffic pathways are necessary for the generation of toxic species. Yeast PICALM orthologs are involved in cellular toxicity, indicating conservation of the mechanisms of toxicity from mammals to yeast. Finally, our model demonstrates the capacity for intracellular A β to cross intracellular membranes and target mitochondrial organelles.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) was first described 100 years ago and is a progressive neurodegenerative pathology leading to gradual cognitive and behavioral changes and loss of memory (Selkoe and Podlisny, 2002). It is associated with the presence of region-specific amyloid- β (A β) deposits in the brain. These amyloid plaques form one of the neuropathological hallmarks of AD. The *APP* gene encodes the amyloid precursor protein (APP), which encompasses the A β peptides. Differential cleavage of APP produces amyloid peptides of 40 (A β ₄₀) or 42 (A β ₄₂) amino acids in length; the A β ₄₀ species are considered to be less toxic. Although A β aggregation is correlated with the extracellular deposition of terminal amyloid plaques in AD patients and AD mouse models, A β species also accumulate within the cell, including inside multivesicular bodies (Almeida et al., 2006; Langui et al., 2004; Takahashi et al., 2002), lysosomes or other vesicular compartments (Nixon, 2007; Shie et al., 2003). Recent publications have confirmed the important role played by intracellular A β , whether it is produced through the secretion pathway, by transfection or by uptake from the medium (Echeverria et al., 2004; Hansson Petersen et al., 2008; Hu et al., 2009; Kandimalla et al., 2009; Rebeck et al., 2010).

Different biological model systems including A β -transgenic *Caenorhabditis elegans* worm (Link, 1995), *Drosophila melanogaster* flies (Crowther et al., 2005; Iijima et al., 2004) and mammalian cell cultures (Magran   et al., 2004) have been used to study the role of intracellular A β . These biological systems have identified general effects such as mitochondrial organization (Zhao et al., 2010; Iijima-Ando et al., 2009) or folding machinery (Fonte et al., 2002; Magran   et al., 2004) as targets or regulators of toxic A β species. These findings have been confirmed in vivo (Hoshino et al., 2011) and are similar to the changes found in pathogenic situations. This supports the notion that part of the complex process leading to AD can be reliably studied at the cellular level. However, the different cell models used so far have not revealed any molecular mechanisms that could account for the toxicity of A β . In addition, pharmacological approaches based on molecules that interfere with A β formation have not been productive. This has raised several questions concerning the paradigm and the models used for these strategies. So far, no simple organism that can be manipulated for a high throughput screening can be used as a 'gold standard' for A β toxicity.

Yeast cells are suitable for such screening and have been widely used to pinpoint gene networks and chemical compounds that can modulate amyloid toxicity. This was particularly the case for Parkinson's disease (Willingham et al., 2003; Cooper et al., 2006; Franssens et al., 2010) and amyotrophic lateral sclerosis (Sun et al., 2011; Ju et al., 2011; Fushimi et al., 2011). Although this experimental model has been successfully used to monitor the aggregation pattern of A β (Bagriantsev and Liebman, 2006; Caine et al., 2007; von der Haar et al., 2007), these first yeast systems failed to recapitulate the toxic properties of this peptide. In these previous studies, A β was expressed in the yeast-cell cytoplasm. Very recently, a new screen based on a secreted form of A β in yeast revealed the importance of the endocytic pathway in cellular toxicity (Treich et al., 2011).

¹Institut de Biochimie et G         Cellulaires, CNRS UMR 5095, Université Bordeaux 2, Victor Segalen, 33077 Bordeaux, France

*These authors contributed equally to this work

  Author for correspondence (cullin@ibgc.cnrs.fr)

Received 23 April 2012; Accepted 2 August 2012

   2012. Published by The Company of Biologists Ltd

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial Share Alike License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly cited and all further distributions of the work or adaptation are subject to the same Creative Commons License terms.

TRANSLATIONAL IMPACT

Clinical issue

The amyloid cascade hypothesis proposes a fundamental role for amyloid- β (A β) in AD. Although found mainly as extracellular deposits, A β seems to impair intracellular mechanisms following the efficient uptake of the peptide. To date, simple cellular systems have not been used to extensively study the toxic mechanisms induced by intracellular A β and, in particular, to address the role of A β secretion and endocytosis in cellular toxicity. Yeast was previously used as a model to study amyloid infectivity and toxicity in other neurodegenerative diseases. More recently, *S. cerevisiae* has also been successfully applied to pinpoint genes involved in A β toxicity; many findings were later confirmed in other eukaryotic models.

Results

This paper presents a new and versatile model involving yeast expression of A β . The authors established a system in which A β enters the secretory pathway, goes to the plasma membrane and subsequently becomes toxic to the cells. A β toxicity depends on the form of A β expressed, with the arctic mutant (A β_{ARC}) being more toxic than the wild-type (A β_{42}), and on the presence of proteins involved in protein trafficking pathways, such as PICALM. Notably, the gene encoding PICALM is a known susceptibility factor for AD. Yeast orthologs of mammalian PICALM increase A β toxicity in this yeast model (in contrast to previous findings in another yeast model that PICALM limits deleterious effects). The authors also demonstrate that A β can cross membranes and target mitochondria.

Implications and future directions

These results indicate that A β must be translocated via the secretory pathway to induce toxicity in yeast cells. This finding is in agreement with other yeast A β -expression models, but is contradictory with respect to the role of the endocytic pathway, highlighting the importance of tailoring the experimental model used to study A β toxicity (which can be influenced by level of expression, stabilization of translational fusion, etc.). This model also pinpoints the mechanisms by which A β disrupts cytoplasmic functions and offers a powerful platform for their characterization. Finally, these results support the idea that mechanisms of A β toxicity in yeast parallel those in mammalian cells, meaning that yeast-based approaches will continue to offer new insights into AD.

In the present study we demonstrate that targeting A β in the secretory pathway produces toxic species. The toxicity depends on the allele expressed, arctic mutants being more harmful than wild-type A β . Disturbance of cell-traffic routes (i.e. secretion, endocytosis, recycling or traffic between Golgi and vacuoles) reduced the toxic effects of A β . Together, these results indicate that in our yeast model, the cellular toxicity is not due to endocytosis dysfunction but rather implicate another cellular target.

RESULTS

A β becomes toxic when expressed with a secretory sequence

It has been clearly established that A β_{40} or A β_{42} expressed in frame with reporter genes such as GFP (Caine et al., 2007) or the functional domain of Sup35 (von der Haar et al., 2007; Bagriantsev and Liebman, 2006) does not lead to yeast death. We fully reproduced this result because, regardless of whether the wild-type (A β_{42}) or arctic mutant (A β_{ARC}) was expressed, the number of colonies formed on galactose (inducing conditions for expression of A β -GFP) or on dextrose (repressing conditions) was the same (Fig. 1). In both cases, the pattern of aggregation was similar, with the presence of bright dots. Because A β toxicity is observed when this peptide is secreted in the fly model of AD (Finelli et al., 2004;

Iijima et al., 2004), it was therefore challenging to test the toxicity to yeast of A β species entering the secretion pathway. When GFP was fused to the mating factor α (MF α) prepro-leader sequence secretion signal derived from the precursor of the *Saccharomyces cerevisiae* MF α (Kurjan and Herskowitz, 1982), there was no marked effect on the colony forming unit (CFU) capacity. Previous studies based on four different yeast secretion signal sequences (i.e. *INUI1*, *SUC2*, *PHOS* and *MEL1*) did not report any toxicity for secreted GFP (Li et al., 2002). By contrast, we observed that expression of MF α -A β_{42} -GFP reduced viability (decrease in CFU) and extended the time required to obtain visible colonies (Fig. 1). Both of these effects were exacerbated when A β_{ARC} was expressed under the same conditions.

One of the problems with GFP chimeric proteins is that cellular properties such as toxicity could be due to GFP itself. We tested this hypothesis by removing GFP from the plasmids (supplementary material Fig. S1) and observed the same toxic phenotypes. The toxicity was clearly lower, but the arctic mutant was still more deleterious than the wild-type A β . Western blot analysis revealed that the level of expression was greatly diminished without GFP (supplementary material Fig. S1). GFP probably helps to stabilize A β peptide but it is clear that all of the toxic properties of A β -GFP can be attributed to the A β part of the chimeric protein.

The MF α -GFP chimera exhibited a low and non-diffuse fluorescence pattern, whereas the MF α -A β -GFP proteins could not be detected by fluorescence. This low signal (or even absence of signal) might be due to a low level of expression, improper GFP folding, post-translational modification or a combination of these factors. To test the possibility of GFP misfolding due to A β aggregation (Wurth et al., 2002), we engineered additional constructs with a linker sequence inserted between A β and GFP. The two new chimeric proteins were as toxic as the two previous constructs (Fig. 1) and could now be detected in yeast cells. This finding ruled out the possibility of GFP misfolding due to its expression throughout the secretory pathway. The same A β -GFP chimeric proteins behaved differently in the cytoplasm (formation of foci and nontoxic) and in the secretory pathway (non-punctiform and toxic). We next checked the processing of MF α -A β -GFP proteins.

Processing of MF α -A β -GFP

Expression of GFP, A β_{42} -GFP or A β_{ARC} -GFP resulted in one species (26 or 31 kDa, respectively) that cross-reacts with anti-GFP antibodies (Fig. 2A, left). By contrast, the secreted forms of A β_{42} -GFP or A β_{ARC} -GFP resulted in three bands (Fig. 2A, right). The smallest (about 34 kDa) and largest species (about 50 kDa) were the most abundant. During galactose induction, these two species were detected first (Fig. 2B); the incapacity to detect the intermediate species early on during induction was probably due to their low concentration (below the sensitivity threshold). The mobility of the smallest species is consistent with the production of the mature proteins. This process requires Kex2p, an endoprotease in the late Golgi compartment (Redding et al., 1991) that is involved in processing α -factor (Julius et al., 1984). To test this hypothesis, we analyzed the different protein species produced in a $\Delta kex2$ strain (Fig. 3A). Indeed, the smallest species were no longer detected, as expected if they were produced by Kex2p. Among the three bands revealed by anti-GFP antibodies, the

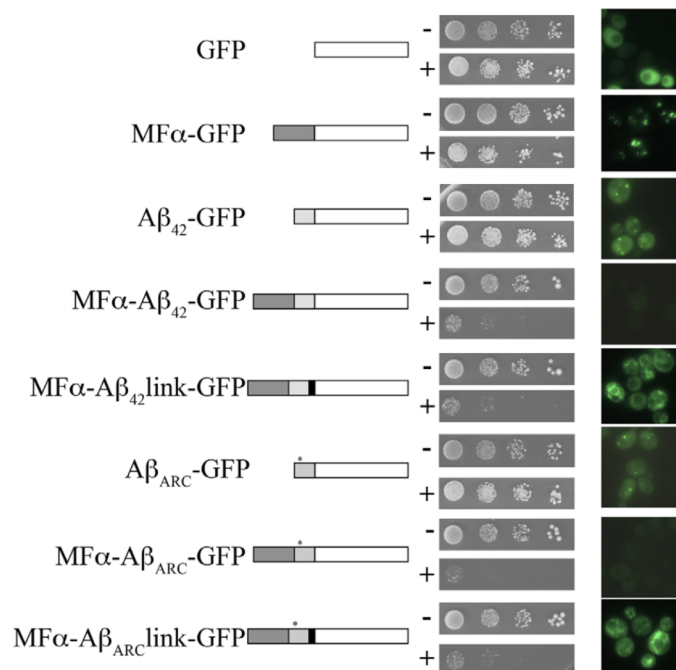


Fig. 1. A β aggregation and yeast growth. Each coding sequence is represented by a rectangle: white for GFP, dark gray for secretory signal, gray for A β and black for the gly-ala linker. * is used for the A β ₄₂ arctic allele. Left: Tenfold dilutions of exponentially growing cultures of BY4742 cells transformed with plasmids carrying the different chimeric constructions under the GAL10 promoter were spotted onto SD (-) or SG (+) agar supplemented with 20 mg/l histidine, 20 mg/l lysine and 60 mg/l leucine. The cells were incubated at 30°C for 3 days. Right: The cells were also grown for 6 hours in SG liquid medium supplemented with 0.67% casamino acids to induce the expression of the chimeric proteins and were examined by epifluorescence microscopy.

highest weight band was bigger than the MF α -A β ₄₂-GFP species (41 kDa). The prepro- α -factor is glycosylated through the yeast secretory pathway (Julius et al., 1984), and the higher mobility could be due to glycosylation of prepro-A β -GFP species. To test this hypothesis, we added a deglycosylation mix to the crude extract. After enzyme treatment, the proteins were analyzed by western blot (Fig. 3B). The highest mobility band was no longer detected whereas the intermediate band was more intense, as expected if this band corresponds to the unglycosylated form of prepro-A β -GFP. The ratio of these three bands depended on the preparation method of the crude extracts (data not shown). This might have been due to a particular protection against proteases and we thus tested the sensitivity of these proteins to proteases. The extracts prepared from yeast spheroplasts revealed four bands instead of three. Proteinase K analysis of the P13 fraction (corresponding to the 13,000 g pellet fraction of yeast lysate prepared under mild conditions) identified the lowest-mobility band as PK-resistant entities (Fig. 3C). This finding is consistent with an intramembranous localization of glycosylated prepro-A β -GFP, but indicates that most of the mature form (A β -GFP) is sensitive to the protease (i.e. is not imbedded in the membranous compartment). Because the proteins enter the secretory pathway, we searched for the presence of GFP species in the medium. It has been previously reported that GFP expressed in frame with different secretory signal peptides did enter the secretory pathway but was not detected in the medium (Li et al., 2002). With our constructs based on the prepro- α -factor peptide, we did not detect any GFP species in the medium using either fluorescence or western blot of concentrated medium (data not shown).

Disturbance of cell-traffic pathways decreases the toxicity triggered by A β chimeric proteins

Prepro-A β -GFP enters the secretory pathway and is clearly toxic to yeast cells. Moreover, the *PICALM* gene, which encodes phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein in mammals, has been recently described as a new susceptibility gene for AD (Harold et al., 2009). In mammalian cells, the neuron-specific AP180 protein and its ubiquitously expressed homolog PICALM (also known as CALM, clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein) are adaptor proteins that participate in clathrin-mediated endocytosis. Adaptors determine the trafficking itinerary of cargos and their steady-state distributions within the cell (Fig. 4). The yeast AP180 proteins are yeast homologs of PICALM (Wendland and Emr, 1998). They share 48% identity, and 25.5% (Yap1801) and 26.5% (Yap1802) identity with PICALM protein. Deletion of *YAP1801* and *YAP1802* clearly decreased the toxicity induced by MF α -A β ₄₂-GFP and MF α -A β _{ARC}-GFP by lowering the growth inhibition (Table 1; supplementary material Fig. S2). We investigated whether the mammalian gene encoding PICALM could complement the *yap1801* and *yap1802* mutants. PICALM has two splice variants designated long (L) and short (S) according to the number of amino acids. The two mouse cDNAs were subcloned into a multi-copy galactose-induced plasmid. The L isoform on its own was toxic in yeast (data not shown) and could thus not be used. Expression of the S isoform of PICALM in *yap1801-yap1802* double-deleted yeast mutants partially restored the growth inhibition observed when MF α -A β ₄₂-GFP or MF α -A β _{ARC}-GFP were expressed in wild-type cells (Fig. 5). This suggests that mouse PICALM protein is able to complement YAP loss of

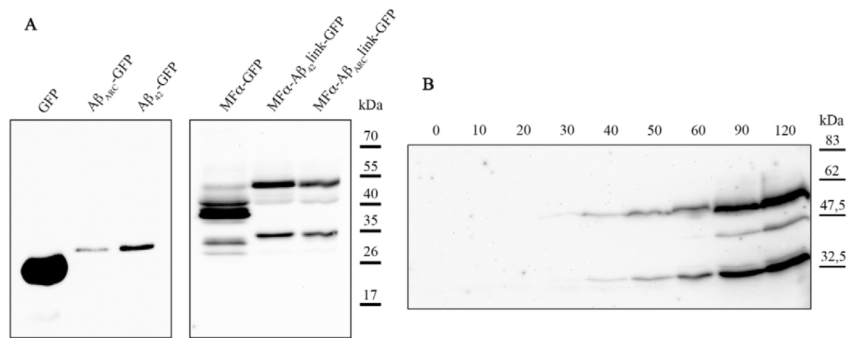


Fig. 2. Maturation of secreted forms of Aβ. (A) BY4742 cells expressing the different chimeric proteins (6 hours of expression) were collected for total-protein extraction. Equal quantities of proteins were separated by SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide gel and were then transferred onto a nitrocellulose membrane and exposed to monoclonal anti-GFP antibodies as indicated. (B) At different time points of the induction (shown in minutes), cells were collected for total-protein extraction. Equal quantities of proteins were separated by SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide gel and were then transferred onto a nitrocellulose membrane and exposed to monoclonal anti-GFP antibodies.

function and that mammal and yeast proteins share a crucial role in Aβ toxicity. In mammalian cells, PICALM interacts with the clathrin-associated adaptor protein complex-2 (AP-2) (Owen et al., 2000), and depletion of PICALM triggers delocalization of the AP-1 adaptor complex (Meyerholz et al., 2005). The toxicity induced by MFα-Aβ₄₂-GFP and MFα-Aβ_{ARC}-GFP was partially suppressed when different subunits of the AP-1 and AP-2 complex were

deleted. Two other classes of adaptors participate with AP-1 in clathrin-mediated transport between the trans-Golgi network (TGN) and endosomes (Fig. 4): Gga2p protein and epsin-like protein Ent5p (Costaguta et al., 2006). The absence of these two proteins also restored growth (Table 1). The only identified cargo that is internalized by Yap1801 and Yap1802 is the vSNARE Snc1p (Burston et al., 2009). Snc1p recycles to the plasma membrane and this recycling requires Rcy1p (Galan et al., 2001). We observed

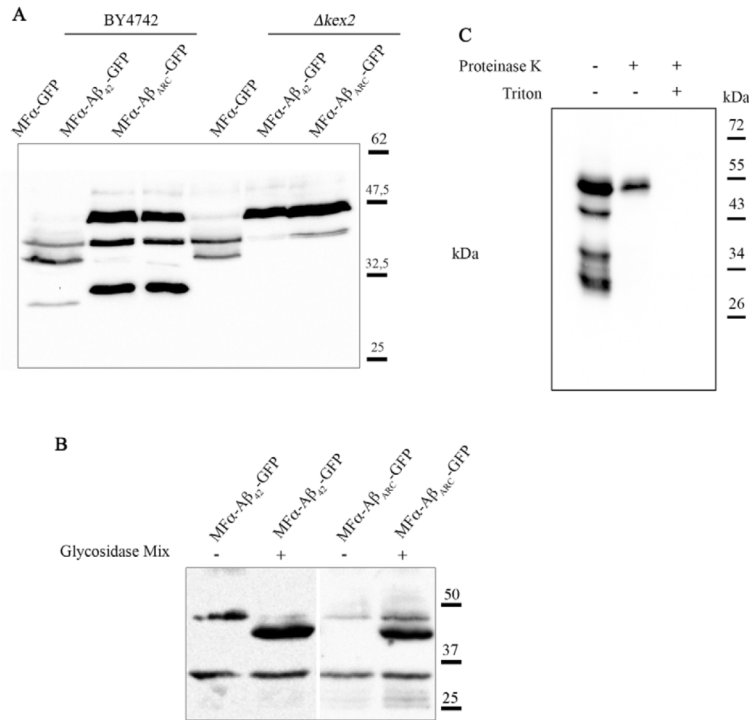


Fig. 3. The secreted forms are glycosylated and processed by Kex2p. (A) BY4742 wild-type or Δkex2 cells expressing the different chimeric proteins (6 hours of expression) were collected for total-protein extraction. Equal quantities of proteins were separated by SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide gel, transferred onto a nitrocellulose membrane and then exposed to monoclonal anti-GFP antibodies. (B) BY4742 expressing the different chimeric proteins (6 hours of expression) were collected for total-protein extraction and submitted or not to a deglycosylation enzyme mix. Equal quantities of proteins were separated by SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide gel, transferred onto a nitrocellulose membrane and exposed to monoclonal anti-GFP antibodies. (C) After spheroplast fractionation of BY4742 cells expressing MFα-Aβ_{ARC}-GFP, P13 fractions were treated with proteinase K (0.3125 mg/ml) in the presence (+) or absence (–) of 5% Triton X-100, resolved by SDS-PAGE and then analyzed by immunoblotting.

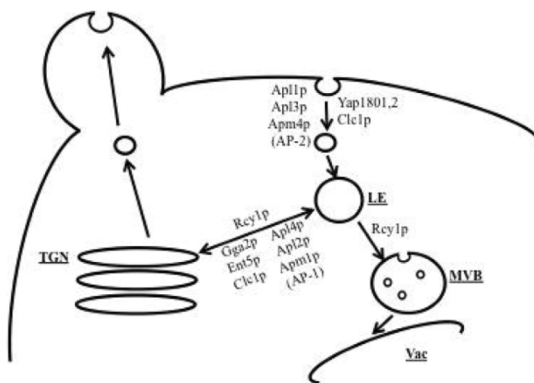


Fig. 4. Schematic view of endocytosis and recycling in yeast. Cellular compartments are indicated: late endosome (LE), multivesicular body (MVB) shown with intraluminal vesicles, vacuole (Vac), and trans-Golgi network (TGN). The proteins involved in some of the steps of endocytosis and recycling are indicated next to the arrows (note that not all proteins are included, only those tested in this study).

that the toxicity induced by MF α -A β ₄₂-GFP and MF α -A β _{ARC}-GFP was strongly suppressed when *RCY1* was deleted (Table 1; supplementary material Fig. S2). Our findings indicate that defects in the endocytic or recycling pathway reduce the toxicity triggered by the A β -GFP chimeric proteins. It is also clear that MF α -A β ₄₂-GFP and MF α -A β _{ARC}-GFP are still toxic in such background.

Cellular localization of A β -GFP

After induction of MF α -A β ₄₂-GFP and MF α -A β _{ARC}-GFP in wild-type cells, proteins present a dual pattern of punctuate and filamentous fluorescent structures (Fig. 1). These two patterns are not found systematically because filamentous organization is observed in most of the fluorescent cells whereas punctuate foci are only present in some of them. In mutants that are lower in A β toxicity and defective for traffic pathways, the ratio of the two fluorescence patterns is inverted. Most of the cells present small foci and we occasionally observed the filamentous pattern (Fig. 6). This correlates the presence of filamentous aggregates with A β toxicity and suggests that the punctuate structures correspond to membrane vesicles.

In mutant strains defective in the early stages of endocytosis, such as the Δ *snf7* mutant, part of GFP fluorescence is associated with the plasma membrane (Fig. 6). In such mutants, membrane invagination into multi-vesicular bodies (MVB) is impaired (Babst et al., 2002) and this decreases the rate of endocytosis. This result shows that the chimeric proteins are able to reach the plasma membrane. Because none of chimeric proteins were detected in the extracellular medium, we speculate that the proteins could be internalized once they had reached the plasma membrane.

The use of yeast cells expressing red fluorescent protein (RFP) fused to proteins whose localization has been characterized previously (Huh et al., 2003) identified the ER as the sole compartment clearly labeled by A β -GFP species (supplementary material Fig. S3). This finding does not rule out the localization of

Table 1. Growth capacity of different strains expressing MF α -A β ₄₂-GFP or MF α -A β _{ARC}-GFP

Complex	Strain	Viability restoration
AP1	Δ <i>apl4</i>	++
	Δ <i>apl2</i>	+
	Δ <i>apm1</i>	++
AP1-associated	Δ <i>gga2</i>	+
	Δ <i>ent5</i>	+
	Δ <i>clc1</i>	+
	Δ <i>rcy1</i>	+++
	Δ <i>rcy1</i>	+++
AP2	Δ <i>apl3</i>	++
	Δ <i>apl1</i>	++
	Δ <i>apm4</i>	++
AP2-associated	Δ <i>yap1801</i>	++
	Δ <i>yap1802</i>	++
	Δ <i>yap1801/\Delta</i> <i>yap1802</i>	++

The growth capacity was evaluated by spotting assays and was compared to wild-type strains expressing the same chimeric proteins or carrying an empty vector.

A β -GFP on other membrane compartments because the speed of the vesicles makes it unlikely to detect both fluorescent signals when they are not observed simultaneously.

These findings show that disturbances of the endocytic or recycling pathways modify the aggregation pattern of MF α -A β ₄₂-GFP and MF α -A β _{ARC}-GFP as well as their cellular toxicity.

Hsp104p plays a role in A β chimeric protein toxicity

Hsp104p is crucial for the toxicity and aggregation of the poly-glutamine Huntingtin protein in yeast (Meriin et al., 2002). Because Hsp104p plays a pivotal role in aggregate formation in yeast, we tested whether this chaperone protein is necessary for the toxicity of A β -GFP chimeric proteins. As indicated in Table 1 and supplementary material Fig. S2, deletion of *HSP104* partially restored the viability of cells expressing MF α -A β ₄₂-GFP and MF α -A β _{ARC}-GFP. This result was unexpected because Hsp104p is a cytosolic protein and MF α -A β ₄₂-GFP and MF α -A β _{ARC}-GFP were associated with the secretory pathway. We therefore conclude that some of the toxic species formed by A β -GFP chimeric proteins become cytosolic. This is consistent with the observation that the mature form detected by western blot analysis is sensitive to proteinase K (Fig. 3C).

In the Δ *hsp104* strain, the fluorescent profile of A β -GFP chimeric proteins was filamentous and no foci were observed (Fig. 6). These results suggest that Hsp104p plays a role in the toxicity of MF α -A β _{ARC}-link-GFP, probably by favoring the conversion of big aggregates into smaller and toxic ones.

Respiratory rate of cells expressing MF α -A β _{ARC}-link-GFP is affected

Mitochondrial dysfunction plays a key role in AD. We therefore tested whether the toxicity triggered by the expression of A β -GFP chimeric proteins in yeast was associated with a mitochondrial disorder. To this end, we monitored the growth and consumption of oxygen in aerobic conditions at different time points after A β induction. Yeast cells transformed with the chimeric constructions

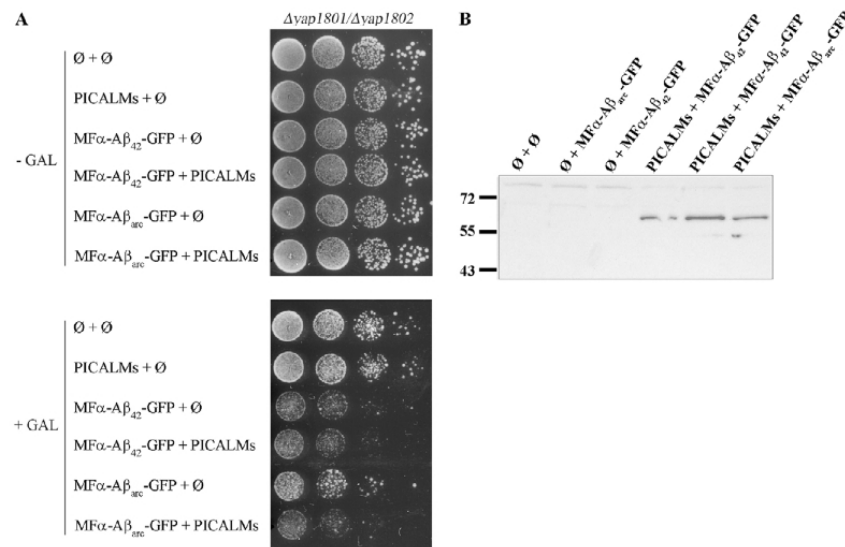


Fig. 5. Mammalian PICALM enhances the toxicity of A β in yeast. (A) Tenfold dilutions of exponentially growing cultures of BY4742 cells transformed with plasmids carrying the different chimeric constructions under the GAL10 promoter and, as indicated, a plasmid containing or not the short form of the PICALM cDNA under the GAL10 promoter were spotted on the same plate onto SD (-) or SG (+) agar supplemented with 20 mg/l histidine, 20 mg/l lysine and 60 mg/l leucine. (B) Deleted strains expressing the different chimeric proteins (6 hours of expression) with or without PICALM protein were collected for total-protein extraction. Proteins were separated by SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide gel, transferred onto a nitrocellulose membrane and then exposed to polyclonal anti-PICALM antibodies (CALM H-134; Santa Cruz Biotechnology).

were grown with lactate as a carbon source and addition of 0.2% galactose at the mid-log phase to induce expression of the chimeric protein. Under these conditions, the growth of cells expressing MF α -GFP or MF α -A β_{ARC} -link-GFP was the same as that for cells carrying an empty vector during the first 4 hours of the induction. After this time, the growth rate of cells expressing the two chimeric proteins slowed, and this slowdown was stronger for cells expressing MF α -A β_{ARC} -link-GFP (Fig. 7A). We then evaluated the respiratory rate of the cells at different times during A β induction (Fig. 7B). The consumption of oxygen by cells with an empty vector or expressing MF α -GFP was unchanged 4 hours after induction (addition of galactose). By contrast, the respiratory rate decreased in the cells expressing MF α -A β_{ARC} -link-GFP. This reduction in oxygen consumption was higher after 8 hours of induction, whereas the respiratory rates of the two controls (empty vector and MF α -GFP) decreased only by a small amount in both cases. This difference was not due to cell lethality because the viability (measured by the number of colonies formed after plating) was the same after 8 hours of induction (data not shown). Such decline of oxygen consumption can be due either to a decrease in mitochondria contents or to a defect in the electron transport chain. We measured the mitochondrial content by recording the optical absorption spectra of mitochondrial cytochromes. The concentration of these different cytochromes is not specifically changed during A β expression (Fig. 7C), as expected if the deleterious effect depends on the inhibition of the respiratory chain.

DISCUSSION

A β must enter the secretory pathway to become toxic

In well-established model organisms such as *Caenorhabditis elegans* (Link, 1995) or *Drosophila melanogaster* (Crowther et al., 2005; Iijima et al., 2004), A β is always expressed in frame with a signal peptide. This expression is thought to represent the mammalian

situation and is expected to yield extracellular A β . These models have shown that physiological impairments can happen before the occurrence of large extracellular deposits and are instead correlated with the intracellular accumulation of A β in worm (Fay et al., 1998) and fly (Crowther et al., 2005). Consistent with these findings, the transgenic mouse AD model (Tg2576) displayed defects in morphology, behavior and memory months before A β_{42} plaque deposition was apparent (Jacobsen et al., 2006). In addition, plaque prevalence does not strictly correlate with dementia in AD (Schmitt et al., 2000; Davies et al., 1988). All of these results imply a pivotal role for intracellular A β , but its production is always puzzling because the protein is directed towards the extracellular space. Despite the usefulness of model organisms, there are no published reports that specifically address the role of the secretory pathway in generating toxic amyloid species. In the present study, we confirm that A β (expressed alone or stabilized by the GFP tag) produced in the cytoplasm does not significantly impair yeast growth. In our hands, and even under harsher conditions (37°C), yeast growth was comparable regardless of whether A β_{1-42} , A β_{ARC} , or GFP alone was expressed. By contrast, translocation of the same species into the secretory pathway could dramatically alter their toxicity. Our results are in complete agreement with those published recently in a yeast system (Treusch et al., 2011).

Chimeric A β -GFP are relevant for toxicity study

Our biological system is based on translational fusion between A β and GFP. With this system, the results are opposite to those of a study recently published in which PICALM orthologous genes protect from A β toxicity (Treusch et al., 2011). In this model, A β is supposed to transit through the secretory pathway to the plasma membrane. A β toxicity is observed only when a huge amount of this peptide is produced. This high production results both from insertion of multiple tandem copies and codon optimization for expression in yeast. At a lower level of expression (one integrated

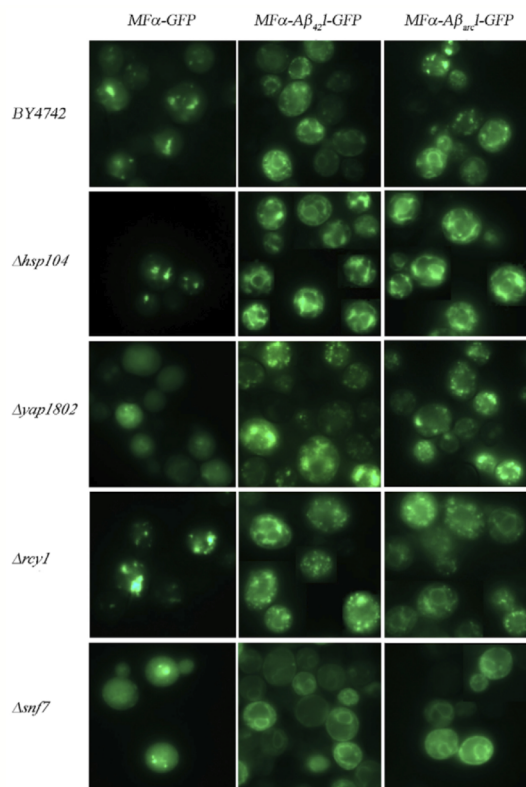


Fig. 6. GFP pattern of aggregation in yeast mutants. Wild-type or strains deleted for *YAP1802*, *HSP104*, *RCY1* or *SNF7* were grown for 6 hours in SG liquid medium supplemented with 0.67% casamino acids to induce expression of the chimeric proteins and were then examined by epifluorescence microscopy.

copy), A β toxicity cannot be detected anymore (supplementary material Fig. S1) (Treusch et al., 2011). Interestingly, the results found with this system were validated in *C. elegans* and rat hippocampal neurons. In these three models, cells are also exposed to huge amount of A β produced into the ER or added in the medium as pre-formed oligomeric A β species. By contrast, when we expressed A β without GFP, we got a modest toxic effect. These results indicate that PICALM might protect cells in the presence of large amounts of A β , but it does not rule out the possibility that the same properties (increasing endocytosis) might lead to an opposite effect when A β concentration is below some threshold value. In our system, the MF α pre-sequence warrants us to follow the efficient entry and processing into the secretory pathway because this sequence is glycosylated and cleaved in the trans-Golgi. It might also change the aggregative properties of A β that behaves, during this traffic, as part of the cargo protein and mimics its properties during APP trafficking. We think that this difference from the other yeast system might also explain some discrepancies. The presence of a folded protein, such as the functional domain of

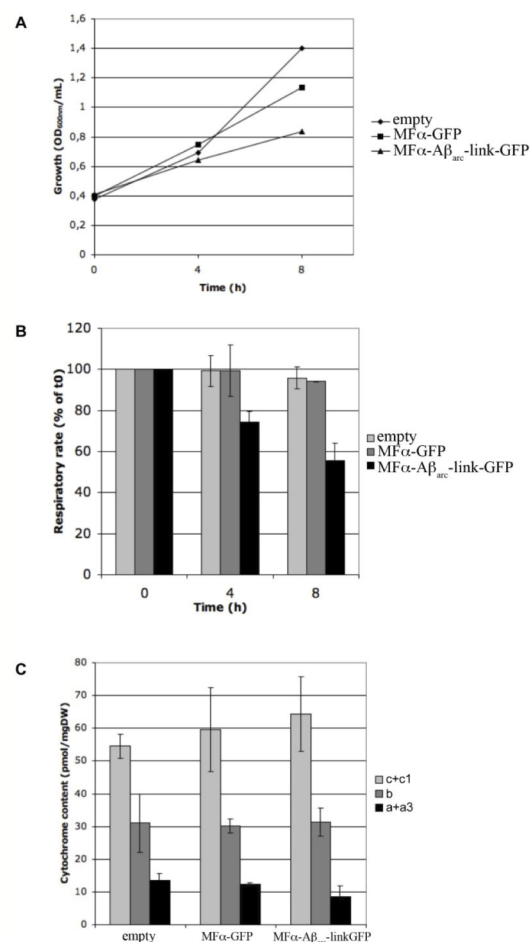


Fig. 7. A β expression leads to a decrease in O $_2$ consumption without changing cytochrome content. (A) BY4742 cells transformed with an empty vector (empty) or plasmids carrying the different chimeric constructions under the GAL10 promoter (MF α -GFP and MF α -A β_{ARC} -link-GFP) were grown aerobically in medium containing 2% DL-lactate and 0.2% galactose. (B) Respiratory rates of BY4742 cells transformed with an empty vector (empty) or plasmids carrying the different chimeric constructions under the GAL10 promoter (MF α -GFP and MF α -A β_{ARC} -link-GFP) (C) Cytochrome content of transformed BY4742 cells at 8 hours after induction. Results are mean \pm s.d. of at least two measurements performed on two independent cell cultures.

the yeast translation termination factor Sup35p, downstream of A β does not change the ability of the natural peptide to aggregate (Bagriantsev and Liebman, 2006). We cannot rule out the possibility that the presence of GFP might interfere with the aggregative properties of A β , but this presence does not change the relative toxic properties of A β (wild-type versus arctic). As A β -GFP enters the secretory pathway, such toxicity could be due to a saturation of the ER-associated degradation (ERAD) system. By determining the expression of a reporter gene, we found that the unfolded

protein response (UPR) is higher when GFP is secreted alone (data not shown), though it is less toxic. In addition, MF α -A β_{ARC} -GFP is more toxic than MF α -A β -GFP and both species are expressed at the same level. It is therefore clear that the toxicity is due to a qualitative effect rather than induced by an overwhelming UPR. This conclusion is consistent with our experiment based on mutants acting downstream to the ER translocation; the toxicity in some of these mutants was clearly lower, indicating that crucial steps for deleterious effects are required in addition to the translocation event.

The yeast model gives new insight for the role of PICALM in AD

Recent genome-wide association studies have identified new genetic risk factors for AD. These studies have focused our attention on *PICALM*, which was identified independently by different groups as a locus associated with AD risk (Lambert et al., 2011; Harold et al., 2009). In contrast with other genes such as *APOE*, *CLU* and *CRI*, which are also risk factors for AD and for which much data is available in the context of AD, little is known about *PICALM*. The Yap180 proteins include Yap1801p and Yap1802p, which are the yeast homologs of PICALM (Wendland and Emr, 1998). Like PICALM, these proteins are involved in the assembly of clathrin cages at sites of formation of endocytic vesicles. Deletions of one or both genes encoding these proteins reduce the toxicity of A β . This decrease in toxicity was clearly reversed when mouse PICALM was expressed in yeast, demonstrating a direct role of the corresponding proteins in A β toxicity. In a different yeast model (Treusch et al., 2011), PICALM has the opposite effect. Their finding led Treusch et al. to conclude that A β expression led to a deficiency in clathrin-mediated endocytosis that could be reversed by YAP overexpression. However, this idea must be tempered by the fact that this mechanism is not essential in yeast and that its failure does not lead to an altered growth phenotype, at least in normal growth conditions. Finally, the functional characterization of PICALM mutations associated with an increase in AD risk will allow the determination of the exact role of this protein in A β toxicity.

Translocated and non-translocated A β forms distinct cytoplasmic aggregates

We established that almost all of the synthesized prepro-A β -GFP enters the secretory pathway. The 41-kDa species (corresponding to the unglycosylated form of prepro-A β -GFP) appeared only as a faint band during western blot analysis. This band was also barely detectable in the $\Delta KEX2$ strain whereas it was the predominant species following deglycosylation treatment of the crude extract. These biochemical properties are consistent with the GFP profile exhibiting a clear ER pattern. Prepro-A β -GFP is thus not diverted to the cytoplasm (or only an extremely small amount is diverted). This putative traffic, if it exists, might be antagonized by selective degradation of the species, but the net result would be the same, i.e. almost all of the detectable protein goes into the secretory pathway. Despite being correctly processed into the secretory pathway, most of the A β peptide is not secreted into the liquid medium, but is retained within the cell. Some mutants showed a clear accumulation of chimeric GFP proteins at the plasma membrane. The protein is thus transported within membrane vesicles to the periphery of the yeast cells. Secreted A β -GFP is processed by the glycosylation machinery and is finally released

into the lumen of the secretory vesicle budding from the trans-Golgi network, where Kex2p is localized (Redding et al., 1991). Aggregation of the protein might occur when A β is still linked to its pre-sequence. However, such aggregation could impair Kex2p processing and it therefore seems reasonable to postulate that aggregation will occur only after cleavage of the pre-sequence. We found that A β toxicity was partially controlled by Hsp104. Hsp104 is a cytoplasmic chaperone that solubilizes large aggregates into smaller species and has been reported to inhibit the fibrillization of monomeric and protofibrillar forms of A β in vitro (Arimon et al., 2008). The function of Hsp104 in A β toxicity is probably direct, leading to the production of smaller entities that might be toxic to yeast cells. This result argues for a cytoplasmic localization of the toxic species. This intracellular localization is somewhat surprising given that the A β_{42} constructs are based on a signal sequence that should have led to the extracellular release of A β_{42} . The same A β -GFP chimeric proteins behave differently when expressed directly in the cytoplasm (formation of foci and not toxic) or in the secretory pathway (undetectable under fluorescence microscope and toxic). The presence of a linker between A β and GFP restores the fluorescence of the secreted protein and we therefore postulate that the lack of fluorescence is due to a particular aggregation of the A β moiety when the protein is secreted. It is already known that partners that aggregate into insoluble material interfere with the ability of GFP to achieve its native fluorescent structure (Waldo et al., 1999). This property has been used to search for A β variants with reduced tendencies to aggregate (Wurth et al., 2002). Our results suggest that the cytoplasmic aggregates formed by the secreted A β are different from the aggregates formed during cytoplasmic expression of A β (without the signal sequence).

With our yeast model, we were able to expand our finding and to demonstrate that the endocytosis and recycling pathways are involved in A β toxicity. In the yeast model, this effect would change the rising of toxic species produced during vesicle transport between the plasma membrane and the Golgi. These species would then escape from the membrane compartment. It has been recently shown in a cellular model that bundles of A β fibrils formed from soluble extracellular A β penetrate the vesicular membrane and extend into the cytoplasm prior to cell death (Friedrich et al., 2010). The same mechanism in yeast could yield cytoplasmic aggregates. Such aggregates could be then taken in charge by Hsp104. In the absence of this disaggregase, the equilibrium would be in favor of large and nontoxic aggregates. By contrast, the presence of Hsp104 would increase the ratio of small and toxic aggregates to larger aggregates. These species would then interact with cellular compartments such as mitochondria. In our model, the change of oxygen consumption was observed very early after A β expression. Because *S. cerevisiae* is a facultative anaerobe, mitochondrial integrity might have been affected without any dramatic change in cell viability. However, the same events could have more severe consequences in mammalian cells.

Our study provides convincing arguments for the use of yeast cells as a cellular model for scoring A β toxicity. Our yeast system is now suitable for screening procedures and will enable many different leads in the search for chemical or genetic modifiers of A β toxicity. Our study also offers a conceptual framework to highlight the role of PICALM and endocytosis in cellular injury and confirms the capacity of A β to cross cellular membranes. This

initial analysis paves the way for further research that should be as powerful as that used to define molecular mechanisms underlying other amyloid related diseases.

METHODS

Yeast strains and media

Yeast strains (listed in supplementary material Table S1) were transformed with plasmids carrying the different chimeric constructs under the *GAL10* promoter and were grown overnight on dextrose medium (0.67% yeast nitrogen base, 2% dextrose) supplemented with 0.67% casamino acids or with some of the following amino acids: 20 mg/l histidine (H), 20 mg/l lysine (K) and 60 mg/l leucine (L). Upon reaching exponential phase ($OD_{600}=1$), the cells were placed in galactose medium supplemented with either 0.67% casamino acids or HKL to induce the expression of chimeric proteins. After 6 hours, cells were either collected to obtain total cell extracts or were observed under epifluorescence.

The *$\Delta yap1801/1802$* strain was constructed by mating the two simple deleted strains *$\Delta yap1801$* and *$\Delta yap1802$* . The mating type of the *$\Delta yap1801$* strain was changed by transforming the strain with a plasmid carrying the *HO* gene. The two strains were then crossed by patching them mixed on a selective medium. After verifying mating by microscopy, the diploid strain was patched onto a sporulation medium. After 3 days of growth, tetrads were dissected and the resistance of the spores to G418 was tested. The G418-resistant spores from the double recombined tetrads were kept as *$\Delta yap1801/1802$* strains. To lose the plasmid carrying the *HO* gene, *$\Delta yap1801/1802$* was then plated onto rich medium containing 5FOA.

Oligonucleotides are listed in supplementary material Table S2. The A β_{1-42} sequence was amplified by PCR from pSG5-APP (a kind gift from Agnès Hémar) using oligonucleotide 792, which introduces a *Bam*HI restriction site at the 5' end of the fragment and an ATG codon at the beginning of the A β_{1-42} sequence, and oligonucleotide 794. The PCR fragment was then inserted into the plasmid pYecHetsYGFP (Couthouis et al., 2009), which had been previously linearized by *Bam*HI using a gap repair method (Orr-Weaver and Szostak, 1983). The pYecA β YGFP and pYecA β_{ARC} YGFP plasmids were constructed by cloning a synthetic sequence in a *Bam*HI-*Bst*XI-digested pYecA β YGFP plasmid. These synthetic sequences, made by GeneScript, were composed of *Bam*HI restriction site followed by α -factor prepro sequence, A β wild-type or arctic mutant coding sequence, the 5' end of the GFP sequence, and a *Bst*XI restriction site. The pYecA β_{ARC} YGFP plasmid was created by overlapping PCR using pYecA β_{ARC} YGFP as a template (with oligonucleotides 705, 706, 859 and 860). This allowed the amplification of a *P_{GAL}*-A β_{ARC} -GFP fragment, which was introduced by a gap repair method into a *Bam*HI-*Bst*XI-digested pYecA β_{ARC} YGFP plasmid. Similarly, *P_{GAL}*- α -factor prepro-GFP and *P_{GAL}*-GFP sequences were created by overlapping PCR using pYecA β YGFP and pYecA β YGFP as templates (with oligonucleotides 705, 706, 856, 857 and 858). The fragments were respectively inserted into pYecA β YGFP and pYecA β GFP *Bam*HI-*Bst*XI-digested plasmids. Each of these plasmids is a multicopy yeast-expression plasmid with the *URA3* selectable marker and a *GAL10* promoter in a pYecHFN2U backbone (Cullin and Minvielle-Sebastia, 1994). CALM long splice variant (CALM-L; GenBank ID BC011470) and short splice variant (CALM-S; GenBank ID

BC021491) from the American Tissue Culture Collection (ATCC) were amplified by PCR using oligonucleotide 951, which introduced a *Bam*HI site at the 5' end of the cDNA and oligonucleotide 952 which introduced a *Not*I site at the 3' end of the cDNA. After digestion by *Bam*HI and *Not*I, the PCR fragment was inserted into the pYecHFN2L plasmid. This plasmid is a multicopy yeast-expression plasmid with an *LEU2* selectable marker and a *GAL10* promoter (Cullin and Minvielle-Sebastia, 1994).

Spotting assay

All spotting assays were performed under the same conditions. Tenfold serial dilutions starting with an equal number of cells (1 OD; where 1=600 nm) were performed in sterile water. Spotting assays were derived from a pool of three independent fresh transformants. Drops of 10 μ l were then plated onto the appropriate SD or SG medium.

Fluorescence microscopy

Cells were washed in water and resuspended in medium. An Axioskop 2 plus (Zeiss) fluorescence microscope was coupled with an AxioCam (Zeiss) black and white camera. The following filters were used: LP-GFP (GFP) and N3 (RFP).

Protein extraction, deglycosylation and western blotting

The alkaline lysis method was used for protein extraction. Briefly, 5 OD units of yeast cells in exponential growth phase were permeabilized with 500 μ l of 0.185 M NaOH, and 0.2% β -mercaptoethanol. After 10 minutes of incubation on ice, trichloroacetic acid (TCA) was added to obtain a final concentration of 5%, and the samples were incubated for an additional 10 minutes on ice. Precipitates were then collected by centrifugation at 13,000 g for 5 minutes. Pellets were dissolved in 35 μ l of dissociation buffer (4% sodium dodecyl sulfate, 0.1 M Tris-HCl pH 6.8, 4 mM EDTA, 20% glycerol, 2% 2-mercaptoethanol and 0.02% Bromophenol Blue) and 15 μ l of 1 M Tris-base. For deglycosylation assays, pellets were suspended in 20 μ l glycoprotein denaturing buffer (Biolabs), incubated for 10 minutes at 100°C, and transferred for a few minutes at 4°C. We then added 5 μ l 10 \times G7 reaction buffer, 5 μ l 10% NP40 and 5 μ l deglycosylation enzyme cocktail (PNGase F, 500,000 U/ml; endo- α -N-acetylgalactosaminidase, 400,000,000 U/ml; neuraminidase, 50,000 U/ml; β 1-4 galactosidase, 8000 U/ml; and β -N-acetylglucosaminidase, 4000 U/ml) to obtain a volume of 50 μ l. The samples were then incubated for 4 hours at 37°C before adding 15 μ l of sample buffer.

Yeast proteins were incubated for 5 minutes at 100°C and separated by SDS-PAGE in a 12% polyacrylamide gel. Proteins were electrically transferred onto nitrocellulose membranes (Optitran BA-S83; Schleicher and Schuell) in the presence of transfer buffer (39 mM glycine, 48 mM Tris-base, 2% EtOH and 0.037% SDS) and were probed with monoclonal anti-GFP antibodies (Sigma) or anti-A β (Tebu) antibodies. Peroxidase-conjugated anti-mouse antibodies (Sigma) were used as secondary antibodies. Binding was detected with the SuperSignal reagent (Pierce) and the VersaDoc Imaging system (BioRad).

Fractionation and proteinase K treatment

250 OD yeast culture in exponential growth phase in SG medium supplemented with 0.67% casamino acids was collected by

centrifugation (4000 *g*), washed in 20 ml H₂O and resuspended in 12 ml of spheroplasting buffer (1.4 M sorbitol, 50 mM Tris-Cl pH 7.5, 40 mM 2-mercaptoethanol and 0.4 mg/ml zymolyase 20T) and incubated for 20 minutes at 30°C without shaking. Spheroplasts were centrifuged for 3 minutes at 1500 *g* at 4°C. The pellet was resuspended in 20 ml of cold lysis buffer (20 mM triethanolamine, 1 mM EDTA pH 7.2, 0.8 M sorbitol, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 5 mg/ml each of leupeptin, chymostatin, aprotinin, pepstatin A and antipain). The spheroplasts were then lysed with a Dounce homogenizer (20 strokes). Lysates were cleared by centrifugation at 500 *g* for 5 minutes at 4°C and the supernatant centrifuged at 13,000 *g* for 10 minutes. The P13 fraction was then used for protease protection assays. P13 fractions were resuspended in lysis buffer and incubated with combinations of 0.3125 mg/ml proteinase K (Roche) and/or 5% Triton X-100 for 30 minutes at 30°C with gentle shaking. The reactions were then stopped with 10% TCA for 10 minutes at 4°C. Samples were then centrifuged at 13,000 *g* for 10 minutes at 4°C and the pellets suspended in 10 μ l protein sample buffer and separated by SDS-PAGE.

Oxygen consumption assays

Cells were grown aerobically at 28°C in the following medium: 0.175% yeast nitrogen base, 0.5% (NH₄)₂SO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.2% DL-lactate (w/v), pH 5.5. Respiration assays of growing cells were performed in the growth medium. Samples of cells were harvested throughout the growth period, washed twice in distilled water and their dry-weight determined. Oxygen consumption was measured polarographically at 28°C using a Clark oxygen electrode in a 1-ml thermostatically controlled chamber. Respiratory rates (JO₂) were determined from the slope of a plot of O₂ concentration versus time and were expressed as natO/minute/mg dry weight.

For determination of cytochrome content, cells were harvested after 8 hours, washed twice with distilled water and concentrated to obtain 2 ml of a cell suspension of about 50 OD units at 600 nm. They were placed in a dual spectrophotometer (Aminco DW2000) and a differential spectrum (from 500 to 650 nm) was obtained from 1 ml of cells in the presence of 1 μ l of 70% H₂O₂ (w/v) (oxidized state) and 1 ml of cells in the presence of a few grains of dithionite (reduced state). Calculations of cytochrome c+c1 and cytochrome b contents were performed using an extinction coefficient of 18,000 M⁻¹cm⁻¹ for the wavelength pairs 550-540 nm and 561-575 nm, respectively. The calculation of cytochrome a+a3 contents was performed using an extinction coefficient of 12,000 M⁻¹cm⁻¹ for the 603-630 nm interval.

ACKNOWLEDGEMENTS

Axel Edelman and Co. have proofread the manuscript.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they do not have any competing or financial interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.D.A. and H.V. performed all of the experiments apart from the EM experiments, which were performed by B.S. J.D.M. set up the centrifugation assays and PK analysis and contributed to scientific discussions. A.D. supervised the respiratory analysis. C.M. and C.C. conceived and partially performed the work and wrote the paper.

FUNDING

F.D.A. was supported by a grant from le Ministère de la Recherche.

Disease Models & Mechanisms

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material for this article is available at <http://dmm.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dmm.010108/-/DC1>

REFERENCES

- Almeida, C. G., Takahashi, R. H. and Gouras, G. K. (2006). Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. *J. Neurosci.* **26**, 4277-4288.
- Arimon, M., Grimminger, V., Sanz, F. and Lashuel, H. A. (2008). Hsp104 targets multiple intermediates on the amyloid pathway and suppresses the seeding capacity of Abeta fibrils and protofibrils. *J. Mol. Biol.* **384**, 1157-1173.
- Babst, M., Katzmann, D. J., Estepa-Sabal, E. J., Meerloo, T. and Emr, S. D. (2002). Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev. Cell* **3**, 271-282.
- Bagriantsev, S. and Liebman, S. (2006). Modulation of Abeta42 low-n oligomerization using a novel yeast reporter system. *BMC Biol.* **4**, 32.
- Burston, H. E., Maldonado-Báez, L., Davey, M., Montpetit, B., Schluter, C., Wendland, B. and Conibear, E. (2009). Regulators of yeast endocytosis identified by systematic quantitative analysis. *J. Cell Biol.* **185**, 1097-1110.
- Caine, J., Sankovich, S., Antony, H., Waddington, L., Macreadie, P., Varghese, J. and Macreadie, I. (2007). Alzheimer's Abeta fused to green fluorescent protein induces growth stress and a heat shock response. *FEMS Yeast Res.* **7**, 1230-1236.
- Cooper, A. A., Gitler, A. D., Cashikar, A., Haynes, C. M., Hill, K. J., Bhullar, B., Liu, K., Xu, K., Strathearn, K. E., Liu, F. et al. (2006). Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* **313**, 324-328.
- Costaguta, G., Duncan, M. C., Fernández, G. E., Huang, G. H. and Payne, G. S. (2006). Distinct roles for TGN/endosome epsin-like adaptors Ent3p and Ent5p. *Mol. Biol. Cell* **17**, 3907-3920.
- Couthouis, J., Rébora, K., Immler, F., Berthelot, K., Castroviejo, M. and Cullin, C. (2009). Screening for toxic amyloid in yeast exemplifies the role of alternative pathway responsible for cytotoxicity. *PLoS ONE* **4**, e4539.
- Crowther, D. C., Kinghorn, K. J., Miranda, E., Page, R., Curry, J. A., Duthie, F. A., Gubb, D. C. and Lomas, D. A. (2005). Intraneuronal Abeta, non-amyloid aggregates and neurodegeneration in a Drosophila model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* **132**, 123-135.
- Cullin, C. and Minvielle-Sebastia, L. (1994). Multipurpose vectors designed for the fast generation of N- or C-terminal epitope-tagged proteins. *Yeast* **10**, 105-112.
- Davies, L., Wolska, B., Hilbich, C., Multhaup, G., Martins, R., Simms, G., Beyreuther, K. and Masters, C. L. (1988). A4 amyloid protein deposition and the diagnosis of Alzheimer's disease: prevalence in aged brains determined by immunocytochemistry compared with conventional neuropathologic techniques. *Neurology* **38**, 1688-1693.
- Echeverria, V., Ducatenzeiler, A., Alhonen, L., Janne, J., Grant, S. M., Wandersell, F., Muro, A., Baralle, F., Li, H., Duff, K. et al. (2004). Rat transgenic models with a phenotype of intracellular Abeta accumulation in hippocampus and cortex. *J. Alzheimers Dis.* **6**, 209-219.
- Fay, D. S., Fluet, A., Johnson, C. J. and Link, C. D. (1998). In vivo aggregation of beta-amyloid peptide variants. *J. Neurochem.* **71**, 1616-1625.
- Finelli, A., Kelkar, A., Song, H.-J., Yang, H. and Konsolaki, M. (2004). A model for studying Alzheimer's Abeta42-induced toxicity in Drosophila melanogaster. *Mol. Cell. Neurosci.* **26**, 365-375.
- Fonte, V., Kapulkin, V., Taft, A., Fluet, A., Friedman, D. and Link, C. D. (2002). Interaction of intracellular beta amyloid peptide with chaperone proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9439-9444.
- Franssens, V., Boelen, E., Anandhakumar, J., Vanhelmont, T., Büttner, S. and Winderickx, J. (2010). Yeast unfolds the road map toward alpha-synuclein-induced cell death. *Cell Death Differ.* **17**, 746-753.
- Friedrich, R. P., Pepper, K., Röncke, R., Soom, M., Westermann, M., Reymann, K., Kaether, C. and Fändrich, M. (2010). Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis of Abeta pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 1942-1947.
- Fushimi, K., Long, C., Jayaram, N., Chen, X., Li, L. and Wu, J. Y. (2011). Expression of human FUS/TLS in yeast leads to protein aggregation and cytotoxicity, recapitulating key features of FUS proteinopathy. *Protein Cell* **2**, 141-149.
- Galan, J. M., Wiederkehr, A., Seol, J. H., Haguenauer-Tsapis, R., Deshaies, R. J., Riezman, H. and Peter, M. (2001). Skp1p and the F-box protein Rcy1p form a non-SCF complex involved in recycling of the SNARE Snc1p in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3105-3117.
- Hansson Petersen, C. A., Alikhani, N., Behbahani, H., Wiehager, B., Pavlov, P. F., Alafuzoff, I., Leinonen, V., Ito, A., Winblad, B., Glaser, E. et al. (2008). The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 13145-13150.
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M. L., Pahwa, J. S., Moskvina, V., Dowzell, K., Williams, A. et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **41**, 1088-1093.

- Hoshino, T., Murao, N., Namba, T., Takehara, M., Adachi, H., Katsuno, M., Sobue, G., Matsushima, T., Suzuki, T. and Mizushima, T. (2011). Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by expression of heat shock protein 70 in mice. *J. Neurosci.* **31**, 5225-5234.
- Hu, X., Crick, S. L., Bu, G., Frieden, C., Pappu, R. V. and Lee, J. M. (2009). Amyloid seeds formed by cellular uptake, concentration, and aggregation of the amyloid-beta peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 20324-20329.
- Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S. and O'Shea, E. K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686-691.
- Iijima, K., Liu, H. P., Chiang, A. S., Hearn, S. A., Konsolaki, M. and Zhong, Y. (2004). Dissecting the pathological effects of human Abeta40 and Abeta42 in *Drosophila*: a potential model for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 6623-6628.
- Iijima-Ando, K., Hearn, S. A., Shenton, C., Gatt, A., Zhao, L. and Iijima, K. (2009). Mitochondrial mislocalization underlies Abeta42-induced neuronal dysfunction in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE* **4**, e8310.
- Jacobsen, J. S., Wu, C. C., Redwine, J. M., Comery, T. A., Arias, R., Bowlby, M., Martone, R., Morrison, J. H., Pangalos, M. N., Reinhart, P. H. et al. (2006). Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 5161-5166.
- Ju, S., Tardiff, D. F., Han, H., Divya, K., Zhong, Q., Maquat, L. E., Bosco, D. A., Hayward, L. J., Brown, R. H., Jr, Lindquist, S. et al. (2011). A yeast model of FUS/TLS-dependent cytotoxicity. *PLoS Biol.* **9**, e1001052.
- Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R. and Thorne, J. (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell* **37**, 1075-1089.
- Kandimalla, K. K., Scott, O. G., Fulzele, S., Davidson, M. W. and Poduslo, J. F. (2009). Mechanism of neuronal versus endothelial cell uptake of Alzheimer's disease amyloid beta protein. *PLoS ONE* **4**, e4627.
- Kurjan, J. and Herskowitz, I. (1982). Structure of a yeast pheromone gene (MF alpha): a putative alpha-factor precursor contains four tandem copies of mature alpha-factor. *Cell* **30**, 933-943.
- Lambert, J. C., Zelenika, D., Hiltunen, M., Chouraki, V., Combarros, O., Bullido, M. J., Tognoni, G., Fiévet, N., Boland, A. et al. (2011). Evidence of the association of BIN1 and PICALM with the AD risk in contrasting European populations. *Neurobiol. Aging* **32**, e11-e15.
- Langui, D., Girardot, N., El Hachimi, K. H., Allinquant, B., Blanchard, V., Pradier, L. and Duyckaerts, C. (2004). Subcellular topography of neuronal Abeta peptide in APPxPS1 transgenic mice. *Am. J. Pathol.* **165**, 1465-1477.
- Li, J., Xu, H., Bentley, W. E. and Rao, G. (2002). Impediments to secretion of green fluorescent protein and its fusion from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* **18**, 831-838.
- Link, C. D. (1995). Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9368-9372.
- Magrané, J., Smith, R. C., Walsh, K. and Querfurth, H. W. (2004). Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons. *J. Neurosci.* **24**, 1700-1706.
- Meriin, A. B., Zhang, X., He, X., Newnam, G. P., Chernoff, Y. O. and Sherman, M. Y. (2002). Huntington toxicity in yeast model depends on polyglutamine aggregation mediated by a prion-like protein Rnq1. *J. Cell Biol.* **157**, 997-1004.
- Meyerholz, A., Hinrichsen, L., Groos, S., Esk, P. C., Brandes, G. and Ungewickell, E. J. (2005). Effect of clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein depletion on clathrin coat formation. *Traffic* **6**, 1225-1234.
- Nixon, R. A. (2007). Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J. Cell Sci.* **120**, 4081-4091.
- Orr-Weaver, T. L. and Szostak, J. W. (1983). Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4417-4421.
- Owen, D. J., Vallis, Y., Pearse, B. M., McMahon, H. T. and Evans, P. R. (2000). The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain. *EMBO J.* **19**, 4216-4227.
- Rebeck, G. W., Hoe, H. S. and Moussa, C. E. (2010). Beta-Amyloid1-42 gene transfer model exhibits intraneuronal amyloid, gliosis, tau phosphorylation, and neuronal loss. *J. Biol. Chem.* **285**, 7440-7446.
- Redding, K., Holcomb, C. and Fuller, R. S. (1991). Immunolocalization of Kex2 protease identifies a putative late Golgi compartment in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **113**, 527-538.
- Schmitt, F. A., Davis, D. G., Wekstein, D. R., Smith, C. D., Ashford, J. W. and Markesbery, W. R. (2000). "Preclinical" AD revisited: neuropathology of cognitively normal older adults. *Neurology* **55**, 370-376.
- Selkoe, D. J. and Podlisny, M. B. (2002). Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **3**, 67-99.
- Shie, F.-S., LeBoeur, R. C. and Jin, L.-W. (2003). Early intraneuronal Abeta deposition in the hippocampus of APP transgenic mice. *Neuroreport* **14**, 123-129.
- Sun, Z., Diaz, Z., Fang, X., Hart, M. P., Chesi, A., Shorter, J. and Gitler, A. D. (2011). Molecular determinants and genetic modifiers of aggregation and toxicity for the ALS disease protein FUS/TLS. *PLoS Biol.* **9**, e1000614.
- Takahashi, R. H., Milner, T. A., Li, F., Nam, E. E., Edgar, M. A., Yamaguchi, H., Beal, M. F., Xu, H., Greengard, P. and Gouras, G. K. (2002). Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *Am. J. Pathol.* **161**, 1869-1879.
- Treusch, S., Hamamichi, S., Goodman, J. L., Matlack, K. E., Chung, C. Y., Baru, V., Shulman, J. M., Parrado, A., Bevis, B. J. et al. (2011). Functional links between A β toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast. *Science* **334**, 1241-1245.
- von der Haar, T., Jossé, L., Wright, P., Zenthon, J. and Tuite, M. F. (2007). Development of a novel yeast cell-based system for studying the aggregation of Alzheimer's disease-associated Abeta peptides in vivo. *Neurodegener. Dis.* **4**, 136-147.
- Waldo, G. S., Standish, B. M., Berendzen, J. and Terwilliger, T. C. (1999). Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **17**, 691-695.
- Wendland, B. and Emr, S. D. (1998). Pan1p, yeast eps15, functions as a multivalent adaptor that coordinates protein-protein interactions essential for endocytosis. *J. Cell Biol.* **141**, 71-84.
- Willingham, S., Outeiro, T. F., DeVit, M. J., Lindquist, S. L. and Muchowski, P. J. (2003). Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or alpha-synuclein. *Science* **302**, 1769-1772.
- Wurth, C., Guimard, N. K. and Hecht, M. H. (2002). Mutations that reduce aggregation of the Alzheimer's Abeta42 peptide: an unbiased search for the sequence determinants of Abeta amyloidogenesis. *J. Mol. Biol.* **319**, 1279-1290.
- Zhao, X. L., Wang, W. A., Tan, J. X., Huang, J. K., Zhang, X., Zhang, B. Z., Wang, Y. H., YangCheng, H. Y., Zhu, H. L. et al. (2010). Expression of beta-amyloid induced age-dependent presynaptic and axonal changes in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **30**, 1512-522.

Figures supplémentaires

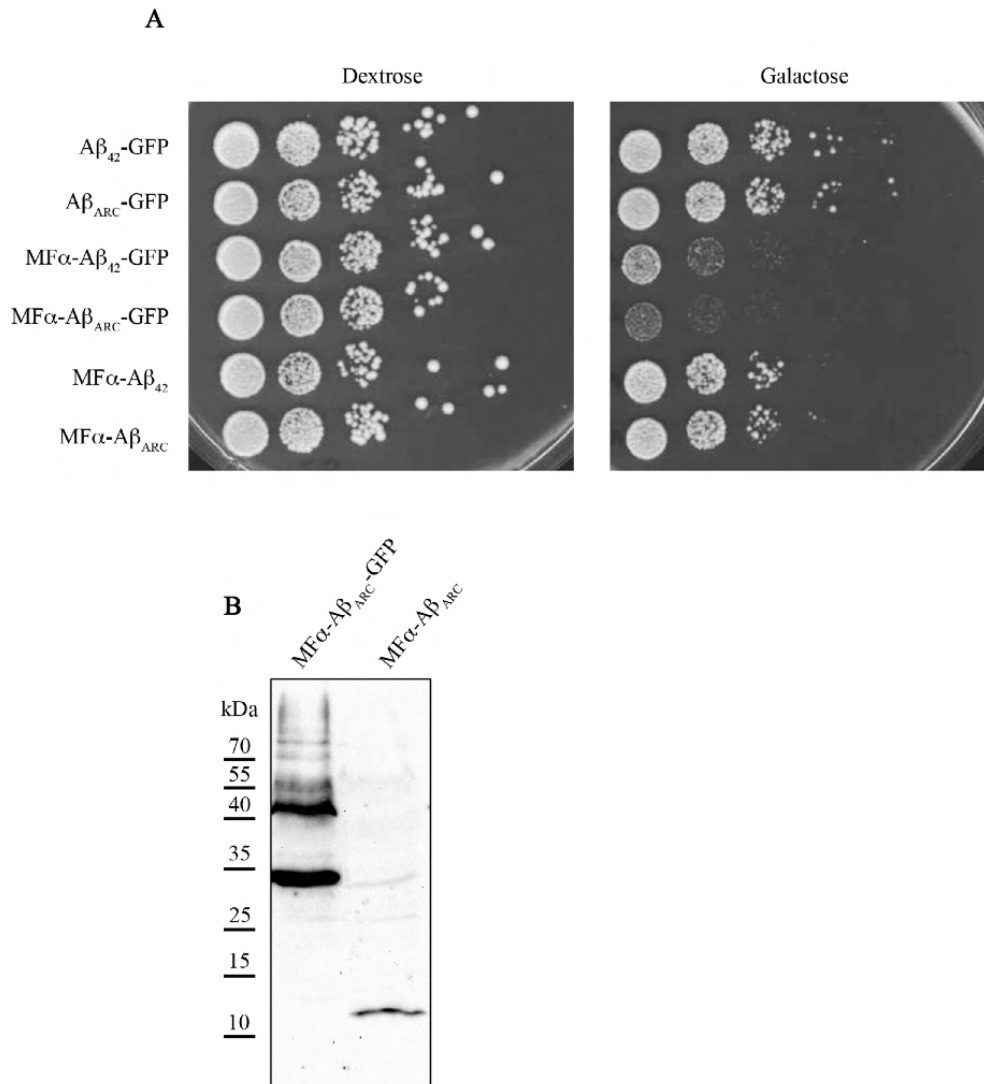


Fig. S1. Toxicity of $A\beta$ alone. (A) Ten-fold dilutions of exponentially growing cultures of BY4742 cells transformed with plasmids carrying the different chimeric constructions under the GAL10 promoter were spotted onto SD (-) or SG (+) agar supplemented with 20 mg/l histidine, 20 mg/l lysine and 60 mg/l leucine. The cells were incubated at 30°C for 3 days. (B) BY4742 cells expressing the different chimeric proteins (6 hours of expression) were collected for total-protein extracts. Equal quantities of proteins were separated by SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide gel, transferred onto a nitrocellulose membrane and exposed to anti- $A\beta$ (Tebu) antibodies.

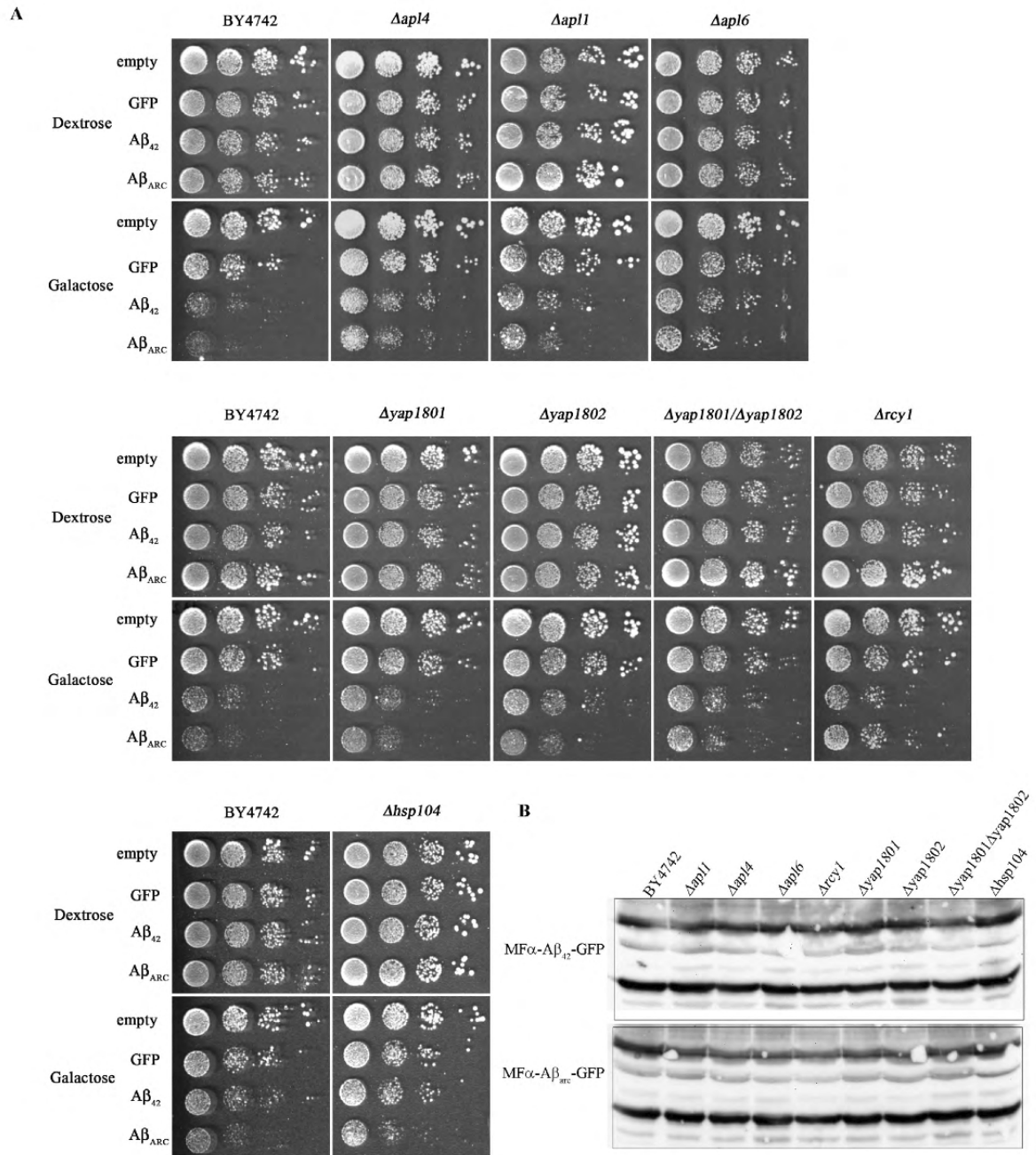


Fig. S2. Yeast mutants modulate $A\beta$ toxicity without changing its protein level. (A) Ten-fold dilutions of exponentially growing cultures of deleted strains transformed with plasmids carrying the different chimeric constructions under the GAL10 promoter were spotted on the same plate onto SD (-) or SG (+) agar supplemented with 20 mg/l histidine, 20 mg/l lysine and 60 mg/l leucine. (B) Cells expressing the different chimeric proteins (6 hours of expression) were collected for total-protein extracts. Equal quantities of proteins were separated by SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide gel, transferred onto a nitrocellulose membrane, and then exposed to monoclonal anti-GFP antibodies (Sigma).

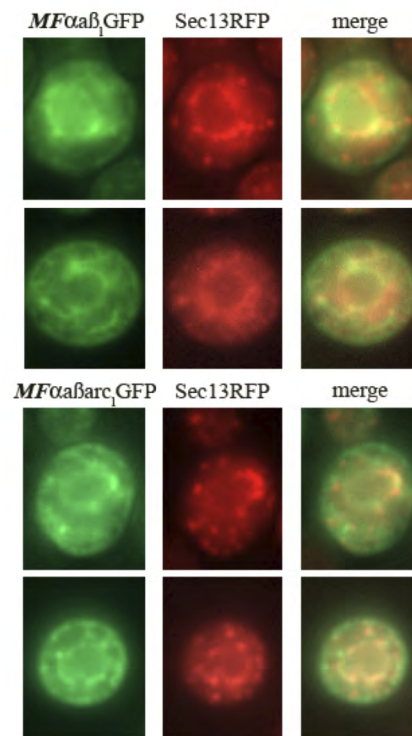


Fig. S3. Aβ-GFP species colocalize with ER. Wild-type or RFP-tagged strains were grown for 6 hours in SG liquid medium supplemented with 0.67% casaminoacids to induce the expression of the chimeric proteins and were then examined by epifluorescence microscopy.

Table 1. Yeast strains used in this study

Name of strain	Genotype	Source
BY4742	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0</i>	Eurocarf yeast deletion library
<i>Δapl4</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, YPR029C::KanMX4</i>	Eurocarf yeast deletion library
<i>Δapl1</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, YJR005W::KanMX4</i>	Eurocarf yeast deletion library
<i>Δapl2</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, YKL135C::KanMX4</i>	Eurocarf yeast deletion library
<i>Δapl3</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, YBL037W::KanMX4</i>	Eurocarf yeast deletion library
<i>Δapm1</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, YPL259C::KanMX4</i>	Eurocarf yeast deletion library
<i>Δapm4</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, YOL062C::KanMX4</i>	Eurocarf yeast deletion library
<i>Δgga2</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, YHR108W::KanMX4</i>	Eurocarf yeast deletion library
<i>Δent5</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, YDR153C::KanMX4</i>	Eurocarf yeast deletion library
<i>Δcle1</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, YGR167W::KanMX4</i>	Eurocarf yeast deletion library
<i>Δrcy1</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, YJL204C::KanMX4</i>	Eurocarf yeast deletion library
<i>Δyap1801</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, YHR161C::KanMX4</i>	Eurocarf yeast deletion library
<i>Δyap1802</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, YGR241C::KanMX4</i>	Eurocarf yeast deletion library
<i>Δhsp104</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2 Δ0, lys2 Δ0, ura3Δ0, YLL026W::KanMX4</i>	Eurocarf yeast deletion library
<i>SEC13-RFP</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2 Δ0, lys2 Δ0, ura3Δ0, YLR208W-RFP-KanMX6</i>	Peter Arvidson
<i>Δyap1801/Δyap1802</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, YHR161C::KanMX4, YGR241C::KanMX4</i>	This study

Table S1. Yeast strains used in this study.**Table S2. Oligonucleotides used in this study**

Number	Sequence
792	AAATACACACACTAAATTACCGGATCCTATGGATGCAGAATTCCGACATG
794	ACCAAGTGAATAATTCTTCACCTTTAGACATCGCTATGACAACACCGCCACC
705	GGATGGCCAGGCAACTTTAG
856	GAATAATTCTTCACCTTTAGACATAGCTTCAGCCTCTCTTTTATC
858	GAATAATTCTTCACCTTTAGACATGGATCCGGTAATTTAGTGTGT
859	GTCATGTCGGAATTCTGCATCCATGGATCCGGTAATTTAGTGTGT
706	TTTACACTTTATGCTTCCGG
857	ATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTC
860	ATGGATGCAGAATTCCGACATG

Table S2. Oligonucleotides used in this study.

I.C. Résultats complémentaires de l'article 1

I.C.1. La toxicité d'A β est allèle-dépendante

L'étude réalisée dans l'article 1 a mis en évidence que l'allèle d'A β responsable d'une forme familiale de la MA, le mutant Arc E22G est plus délétère pour les levures que l'allèle sauvage. Afin de conforter cette toxicité allèle-dépendante, nous avons construit, par mutagenèse dirigée, les allèles suivants : English H6R, Tottori D7N, Dutch E22Q et Iowa D23N. Le mutant Flemish A21G a également été construit en guise de contrôle positif. En effet, chez l'Homme, cette mutation induit un changement de ratio d'A β_{42} /A β_{40} , et ne doit pas générer un peptide A β de plus grande toxicité qu'A β_{wt} .

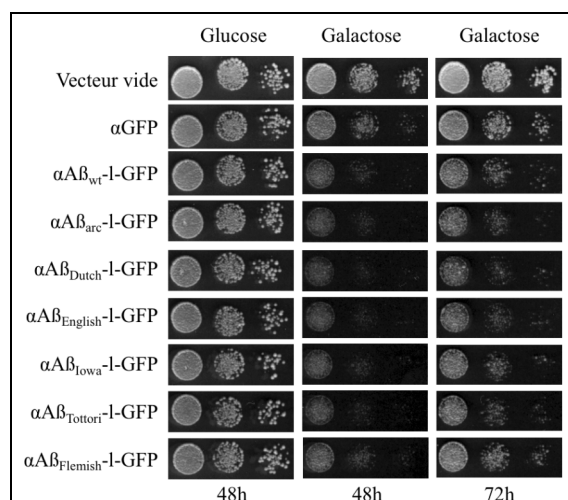


Figure 26 : Test en gouttes des mutants familiaux d'A β_{42} .

La croissance des levures en milieu non inducteur (glucose) est comparable quelles que soient les constructions. En milieu inducteur galactose, les levures présentent un défaut de croissance transitoire. En effet, les effets observés à 48h de croissance à 30°C sont moins visibles après 72h de croissance.

L'expression des constructions α A $\beta_{English}$ -l-GFP, α A $\beta_{Tottori}$ -l-GFP, α A β_{Dutch} -l-GFP et α A β_{arc} -l-GFP induisent un défaut de croissance des levures en milieu inducteur supérieur à celui d'A β_{wt} . Les constructions α A β_{Iowa} -l-GFP et α A $\beta_{Flemish}$ -l-GFP induisent une toxicité comparable à celle d' α A β_{wt} -l-GFP. Ces phénotypes sont cependant tous transitoires, après

72h de croissance, la toxicité des mutants ne se distingue pas de celle de la forme sauvage (Figure 26).

Ces différences de toxicité ne sont pas dues à des variations majeures de quantité de protéines produites, ni du ratio des formes (précurseur, glycosylée, mature) qui ont été analysées en western blot (non montré). Aucune variation des profils de fluorescence n'a pu être détecté par rapport à ceux d' $\alpha A\beta_{arc}$ -l-GFP et $\alpha A\beta_{wt}$ -l-GFP. En effet, les cellules présentent un profil de fluorescence comprenant un anneau périnucléaire, des structures fibrillaires et ponctiformes (Figure 27).

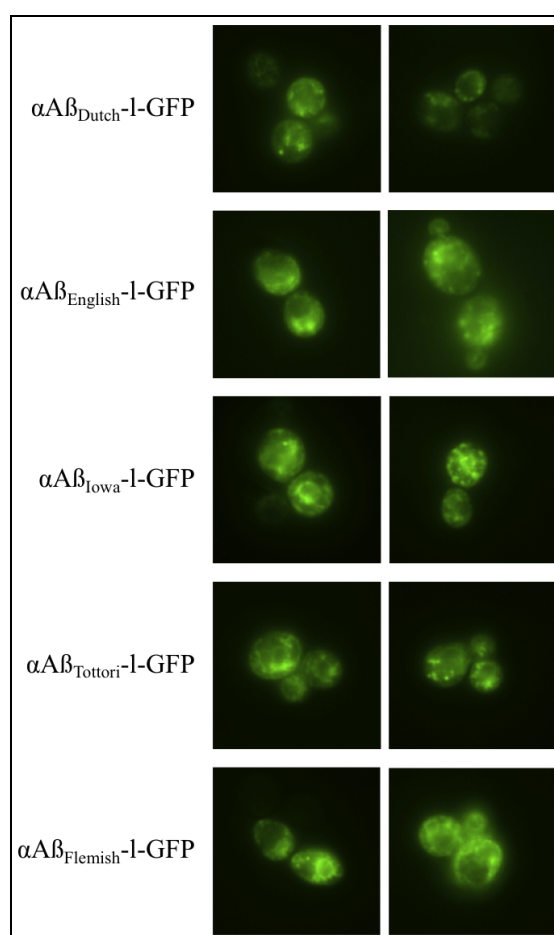


Figure 27 : Profils de fluorescence des mutants familiaux d' $A\beta_{42}$.

Après 6 h d'induction en galactose, les levures exprimant les constructions indiquées sont observées en microscopie à épifluorescence.

L'ensemble de ces résultats indique que la toxicité d'A β ₄₂ dans ce modèle est dépendante de l'allèle d'A β et semble être corrélée à ses propriétés spécifiques d'agrégation. Il montre également que les allèles « naturels » ne sont pas dramatiquement délétères pour la viabilité cellulaire.

I.C.2. Les effets d'A β sur les mitochondries

L'expression d' α A β _{arc}IGFP induit une diminution de la croissance en milieu respiratoire (lactate), associée à une diminution de la consommation d'oxygène par cellule. Nous avons montré que cette diminution n'est pas liée à une létalité mesurée par la capacité à former des colonies (cfu), ni à une diminution du contenu mitochondrial évaluée par dosage spectral sur cellules totales, mais bien à une altération de la chaîne respiratoire.

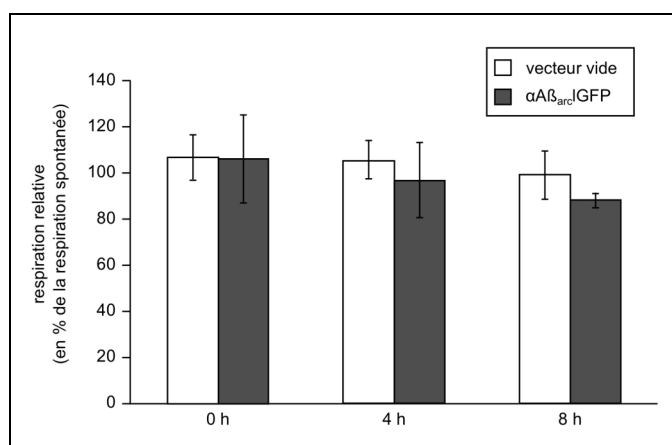


Figure 28 : Respirations relatives de levures en présence d'éthanol.

Les mesures sont effectuées sur des échantillons de levures dans leur milieu de culture (respiration spontanée) et après l'ajout d'éthanol (1% final) directement dans le milieu de l'échantillon. En blanc, les levures transformées par le plasmide vide, en gris, les levures exprimant la construction α A β _{arc}IGFP (n=3).

Une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire peut être liée à la diminution de substrats, notamment de NADH, qui devient alors limitant. L'ajout d'éthanol dans ces conditions fournit du NADH directement à la chaîne respiratoire grâce à la présence d'une

alcool déshydrogénase matricielle. L'absence de différence majeure de vitesse de consommation d'oxygène en présence et en absence d'éthanol nous indique que la diminution de la respiration n'est pas due à une limitation de la vitesse de la chaîne respiratoire par le NADH (Figure 28).

L'inhibition de la respiration en présence de triéthyltin (TET), un inhibiteur de l'ATP synthase, est similaire dans le contrôle vecteur vide et dans pour les cellules exprimant $\alpha A\beta_{arc}$ IGFP.

Les résultats suivants sont à aborder avec une grande prudence puisque cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois. Le découplage, par dispersion du gradient de proton grâce à l'ajout de carbonyl cyanide m-chloro-phenyl hydrazone (CCCP), de la chaîne respiratoire et de la synthèse d'ATP induit une augmentation de la vitesse de consommation d'oxygène moindre chez les levures exprimant $\alpha A\beta_{arc}$ IGFP. La vitesse maximale est diminuée, ce qui pourrait correspondre à une inhibition de la chaîne respiratoire. Ces résultats doivent impérativement être consolidés.

Les effets délétères de l'expression d' $\alpha A\beta_{arc}$ IGFP sur la consommation d'oxygène ne sont donc pas dus ni à une mortalité accrue, ni à un changement quantitatif de mitochondries ou de cytochromes, mais plutôt à un effet sur la chaîne respiratoire elle-même. La description de ces effets pourrait être facilitée par l'étude des effets d' $A\beta$ sur mitochondries isolées.

I.C.3. Recherche de partenaires cellulaires d' $A\beta$

Les différences de toxicité d' $A\beta_{wt}$ et $A\beta_{arc}$ pourraient être dues à l'interaction des constructions avec des partenaires particuliers.

Afin de tenter d'identifier ces potentiels partenaires cellulaires spécifiques d' $\alpha A\beta_{wt}$ GFP et/ou d' $\alpha A\beta_{arc}$ GFP, des expériences d'immuno-précipitations ont été effectuées.

Des broyats de levures exprimant les différentes constructions $\alpha A\beta_{wt}GFP$, $\alpha A\beta_{arc}GFP$ et αGFP depuis 8 ou 24 heures ont été incubés avec des anticorps anti-GFP couplés à des billes magnétiques, permettant de les purifier aisément dans le champ magnétique d'un aimant. Les immuno-précipitations ont ensuite été analysées par SDS PAGE et western blot (non montré).

Une coloration à l'argent des gels a permis de comparer les profils d'élutions des immuno-précipitations. Parallèlement, des western blot ont été réalisés permettant d'identifier les bandes correspondant aux différentes formes de la protéine de fusion : précurseur (P), forme glycosylée (G) et forme mature (M).

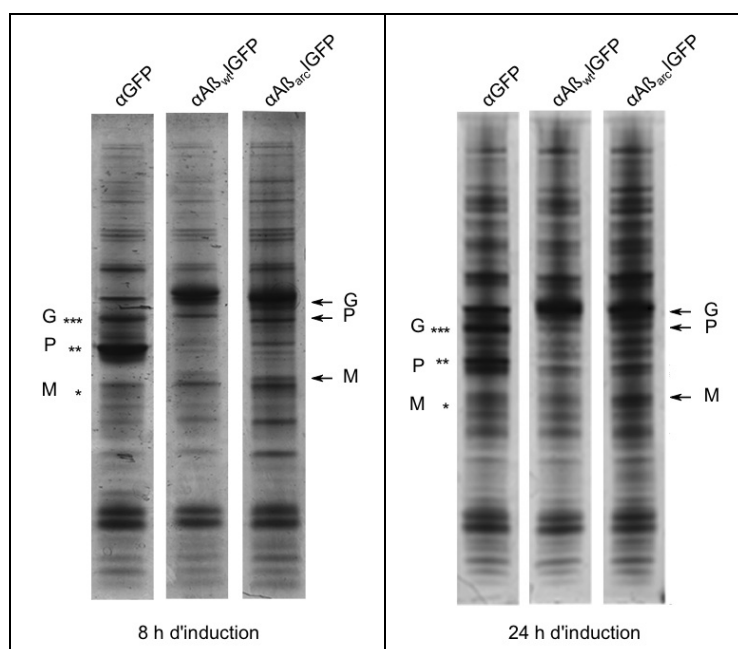


Figure 29 : Profil de migration en gel d'acrylamide coloré à l'argent des immuno-précipitations de GFP.

Les levures exprimant les constructions αGFP (pistes de gauche), $\alpha A\beta_{wt}IGFP$ (pistes centrales) et $\alpha A\beta_{arc}IGFP$ (pistes de droites) après 8 heures d'induction (panneau de gauche) ou 24h d'induction (panneau de droite). Les flèches indiquent les bandes correspondant aux formes précurseurs (P), glycosylées (G) et matures (M) des constructions $\alpha A\beta IGFP$. Les mêmes formes sont indiquées pour αGFP (*).

La comparaison des trois profils ne montre pas de différences majeures, exceptées les bandes intenses correspondant aux constructions elles-mêmes (Figure 29, flèches et *) . Quelques bandes présentent des variations d'intensité, mais toutes les bandes présentes dans les précipitations de $\alpha A\beta_{wt}$ IGFP et $\alpha A\beta_{arc}$ IGFP se retrouvent dans celles d' α GFP.

Aucun partenaire spécifique d' $A\beta_{wt}$ ou $A\beta_{arc}$ n'a donc pu être mis en évidence par cette méthode.

II. Étude structure - toxicité d'Aβ₄₂

II.A. Introduction

Grâce au modèle de toxicité d'Aβ dans la levure, nous avons entrepris l'étude structure-toxicité du peptide. L'utilisation de la levure permet ainsi de cribler des mutants d'Aβ présentant des variations de toxicité par rapport à celle d'Aβ_{wt}GFP.

La recherche d'allèles très toxiques d'Aβ a débuté par la mutagenèse aléatoire de fragment d'Aβ par PCR mutagénisante. Ces fragments ont ensuite été réintégrés au vecteur d'expression par recombinaison homologue. Un crible de sélection négatif a permis d'identifier une quarantaine de mutants à la toxicité exacerbée, présentant des mutations sur l'ensemble de la séquence d'Aβ. Seuls quelques résidus ne présentent aucunes de mutations, laissant supposer qu'ils sont nécessaires à la toxicité d'Aβ. Une mutagenèse ciblée de ces résidus a permis d'établir que les résidus Ile31 et Leu34 sont nécessaires à la toxicité d'Aβ.

Cette collection de mutants toxiques et non toxiques a donc été créée sans a priori sur les positions des mutations. Afin de distinguer ce qui différencie un peptide Aβ toxique d'un Aβ non toxique, l'étude biochimique *in vitro* de ces mutants a été entreprise.

Les mutations correspondant aux mutants simples d'Aβ suivants ont été transposées dans la phase codante d'Aβ coli : G37C (très toxique), arc E22G et L34T (non toxique). Leur expression et purification ont été mises au point, ainsi que celle d'Aβ_{wt}. La dernière étape de la purification de ces variants, une chromatographie d'exclusion de taille, a permis de mettre en évidence une corrélation entre toxicité et formation d'oligomères. Tandis que les monomères possèdent une voie d'assemblage commune aboutissant à la formation de fibrilles agencées en feuillets β parallèles, les oligomères possèdent une voie d'assemblage distincte, riche en feuillets β anti-parallèles. Ces oligomères présentent une toxicité accrue sur des cellules en culture. Ce travail a donc permis de mettre en évidence une nouvelle voie d'assemblage en feuillets β anti-parallèles des variants toxiques d'Aβ.

II.B. Article 2 : « A structure-toxicity study of A β ₄₂ reveals a new anti-parallel aggregation pathway »

A structure-toxicity study of A β ₄₂ reveals a new anti-parallel aggregation pathway

Hélène Vignaud^{*}, Claude Bobo^{*}, Ioan Lascu^{*}, Karin Margareta Sörgjerd[#], Tamotsu Zako[#], Mizuo Maeda[#], Benedicte Salin ^{*}, Sophie Lecomte[°] and Christophe Cullin^{*1}.

^{*}Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS UMR 5095, Université Bordeaux Segalen, 33077 Bordeaux, France.

[#] Bioengineering Laboratory RIKEN Institute, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan

[°] Chimie et Biologie des Membranes et Nano-objets, CNRS UMR 5248, Université Bordeaux 1, IPB, 14 allée Geoffroy de Saint Hilaire, 33600 Pessac France

¹ Corresponding author

Short Title: A β toxic pathway

To whom correspondance must be addressed: Prof. C. Cullin, IBGC, 1 rue Camille Saint Saëns, 33077 Bordeaux cedex, France Tel/Fax + 33(0) 556 999 017 E-mail: Christophe.Cullin@IBGC.CNRS.Fr

Keywords: amyloid toxicity, FTIR, anti parallel β sheets

Abstract

Amyloid beta (A β) peptides produced by APP cleavage are central to the pathology of Alzheimer's disease. Despite widespread interest in this issue, the relationship between the auto-assembly and toxicity of these peptides remains controversial. One intriguing feature stems from their capacity to form anti-parallel β -sheet oligomeric intermediates that can be converted into a parallel topology to allow the formation of protofibrillar and fibrillar A β . Here, we present a novel approach to determining the molecular aspects of A β assembly that is responsible for its *in vivo* toxicity. We selected A β mutants with varying intracellular toxicities. *In vitro*, only toxic A β (including wild-type A β_{42}) formed urea-resistant oligomers. These oligomers were able to assemble into fibrils that are rich in anti-parallel β -sheet structures. Our results support the existence of a new pathway that depends on the folding capacity of A β .

Introduction

Amyloid proteins and peptides form a large group of unrelated proteins. Some of these proteins are used for their biophysical properties (e.g., spidroin, the major spider silk protein [1]) or, their capacity to mimic a loss- of -function phenotype (e.g.,like Ure2p in *S. cerevisiae*, responsible for the [URE3] prion phenotype [2]). Amyloid proteins are also involved in many different cellular functions [3,4]. Furthermore, amyloid assembly may also be a convenient mechanism for storing peptide and protein hormones in the secretory granules of the endocrine system [5]. These amyloid structures are formed by the stacking of parallel or anti-parallel β -strands into β -sheets that are orthogonal to the fibril axis and are often stabilized by the lateral association of several different sheets. Despite these positive roles, amyloids are most often studied in the context of disease, particularly neurodegenerative diseases. This is mainly due to the detrimental roles of the huntingtin, alpha-synuclein, prion, and amyloid beta proteins in Huntington's, Parkinson's, Creutzfeldt-Jakob, and Alzheimer's diseases, respectively. Understanding the toxicity of these amyloids is a challenging goal and is being pursued by many scientists.

Amyloid proteins assemble *via* structurally and kinetically common mechanisms involving monomers (which are often unstructured for *in vitro* experiments [6]), oligomers (which often share structural characteristics that are recognized by specific antibodies, independent of their primary structure [7]), protofibrils, and fibrils. The amyloid auto-assembly process is a matter of great interest because the toxicity of amyloid proteins is clearly related to their fibrillation properties. The concept that toxic intermediates are responsible for cell death has become dogma in the field [8,9], fueling interest in isolating these intermediates.

This search has indeed been intensive in the field of Alzheimer's disease research. The metabolism of APP and, in particular, the rate of production of A β peptides (39-43 residues) are thought to be key events in the pathological process [10,11]. Studies of A β aggregation have strengthened the link between amyloid intermediates and disease. The identification of pathogenic point mutations within A β sequences allowed researchers to focus on these intermediates rather than fibrils [12,13]. Since that time, many different intermediates of varying size (from two to hundreds of A β molecules) and structure (both parallel and anti-parallel β -sheets) have been suspected to act as "partners in crime" [14,15]. However, the lack of standardized methods [16] and the difficulty of linking *in vitro* biochemical observations to *in vivo* toxicity make it difficult to reconcile these disparate results.

In this study, we used a biological system that permits structure-toxicity studies [17]. This approach has been successfully used in our lab for another amyloid peptide [18] and allowed us to highlight the role of anti-parallel β -sheet amyloids in cellular toxicity [19]. We were thus able to address the following question: what distinguishes a harmless $A\beta_{42}$ from a toxic $A\beta_{42}$? We performed an *in vivo* screen without any *a priori* information about the biochemical nature of the mutations and isolated several $A\beta_{42}$ single mutants varying from harmless to very damaging. The *in vitro* analysis of these mutants led to the identification of a new pathway based on anti-parallel β -sheet organization. This pathway causes the formation of fibrils that are structurally distinct from the classical-fibrils with parallel in-register structure of $A\beta$ [20].

Materials and Methods

Yeast strains, media, and plasmids

The yeast strain used was BY4742 (*MAT a*, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *lys2Δ0*, *ura3Δ0*). Yeast cells were grown in SD medium (0.67 % yeast nitrogen base, 2 % dextrose) or SG medium (0.67 % yeast nitrogen base, 2 % galactose) supplemented with 0.67 % casaminoacids or with 20 mg/L histidine (H), 20 mg/L lysine (K) and 60 mg/L leucine (L).

All expression vectors used were derived from pYeaAβYGFP [17], a multicopy yeast-expression plasmid with the selectable *URA3* marker and a *GAL10* promoter in a pYehFN2U backbone [21]. A *PvuII* site was inserted between the pre-pro-sequence of alpha factor and GFP by overlapping PCR using pYeaAβGFP and pYeaαGFP as templates for the primers 705, 706, 866 and 867 (Table I). This allowed the amplification of a PGAL-α-*PvuII*-YGFP fragment, which was cloned into the *Bam*HI-*Eco*RI sites of pYeaAβGFP. Expression vectors of αAβ and αAβarc without GFP were created by PCR amplification from pYeaαAβYGFP or pYeaαAβarcYGFP templates using 705 and 879 primers. Fragments were cloned into the *Bam*HI-*Bsu*36I sites of pYeaαAβYGFP. Expression vector of αAβ_{G37C} without GFP was created by PCR amplification from pYeaαAβ_{G37C}YGFP (see *Mutagenesis*) using 705 and 960 primers. The PCR product was introduced by gap repair method into a *PvuII*-linearized pYeaα-*PvuII*-YGFP 2U plasmid. The empty vector used as control is pYehFN2U. For the co-transformation experiments, the selectable marker *URA3* was shuffled into the *LEU2* cassette coming from pFL36 [22]

The expression vector for Aβ₄₂ in *E. coli* was a kind gift from D. Walsh and was described previously as Aβ (M1-42) [23]. Substitutions were introduced by site-directed mutagenesis using the QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) according to the supplier's recommendations. The primers used are shown in Table I.

Mutagenesis

The Aβ sequence was amplified by PCR from pYeaαAβYGFP using primers 861 and 902 (Table I). A Taq DNA polymerase with no proofreading activity (New England Biolabs M0237 Taq DNA polymerase) was used under error-prone reaction conditions (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH8.3, 4.76 mM MgSO₄, 0.5 mM MnCl₂) with the following nucleotide concentrations: 0.09 mM dCTP, 0.06 mM dATP, 0.14 mM dTTP, and 0.02 mM dGTP. The corresponding PCR products were cloned by the gap repair method into a *PvuII*-linearized pYeaα-*PvuII*-YGFP2U plasmid.

The mutagenesis of “non-toxic” residues was performed using the QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit according to the supplier’s recommendations. The degenerate primers used are shown in Table I (primers 980 and 981 for valine 12 mutagenesis, 984 and 985 for isoleucine 31, and 986 and 987 for leucine 34).

Isolation of toxic mutants:

The library obtained after the gap repair was plated onto SD casa medium. After replication on SG HKL medium, colonies that exhibited growth defects were isolated and spotted individually. In this study, 6,000 clones were analyzed, and 39 were confirmed to have a toxic phenotype. The plasmids were then extracted and re-transformed into *S. cerevisiae* after an amplification step in *E.coli*. Clones with interesting phenotypes were sequenced.

Spotting assay:

Tenfold serial dilutions starting with equal numbers of cells (10^6 cells) were performed in sterile water. The cells for spotting assays were derived from a pool of ten independent fresh transformants; 10 μ L drops were loaded on the appropriate SD and SG media.

Protein extraction and western blotting:

Alkaline lysis was used for protein extraction. Five OD units of yeast cells in the exponential growth phase were permeabilized with 500 μ L of 0.185 M NaOH and 0.2 % β -mercaptoethanol. After 10 min on ice, trichloroacetic acid (TCA) was added to a final concentration of 5 %. Samples were incubated for an additional 10 min on ice. Precipitates were collected by centrifugation at 13,000 g for 5 min, and pellets were dissolved in 35 μ L of dissociation buffer (4 % SDS, 0.1 M Tris-HCl pH 6.8, 4 mM EDTA, 20 % glycerol, 2 % β -mercaptoethanol and 0.02 % bromophenol blue) and 15 μ L of 1 M Tris-base.

Extracts were incubated for 5 min at 100 °C and separated by SDS-PAGE in a 12 % polyacrylamide gel. Gels were either stained with PageBlue Protein Straining Solution (Fermentas) according to supplier’s recommendations, or transferred on nitrocellulose membrane. After semi-dry transfer, the membranes were probed with monoclonal anti-A β antibodies (Santa-Cruz Biotechnology). Peroxidase-conjugated anti-mouse antibodies (Sigma) secondary antibodies were used. Binding was detected with the SuperSignal reagent and the G:Box system (Syngene).

Fluorescence microscopy:

Cells in the exponential growth phase were washed in water and resuspended in SG medium. After 8 h, cells were observed with an Axioskop 2 plus fluorescence microscope (Zeiss) coupled with an AxioCam black and white camera (Zeiss). The LP-GFP filter was used.

A β expression and purification:

A ZYM-5052 auto-inductive system was used for A β expression [24]. Briefly, several clones of transformed BL21 DE3 PLys S were grown on 10 mL LB medium preculture that contained 1 % dextrose, 100 mg/L ampicillin, and 25 mg/L chloramphenicol. A one-day preculture was added to 990 mL of ZYM 5052 medium (1 % N-Z-amine, 0.5 % yeast extract, 25 mM Na₂HPO₄, 25 mM KH₂PO₄, 50 mM NH₄Cl, 5 mM Na₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.5 % glycerol, 0.05 % dextrose, 0.2 % lactose) containing 100 mg/L ampicillin and 25 mg/L chloramphenicol and incubated overnight at 37 °C.

Cell pellets were resuspended at 1 g per 2.5 mL of TE buffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8). Inclusion bodies were purified as described previously [23]. Briefly, cells were sonicated twice (each passage of three min cycles on ice; output 5, 50 % duty cycle) and then centrifuged for 15 min at 30,000 g at 4 °C. The pellet was resuspended in TE buffer (1 ml for 1 g), sonicated for 3 min on ice, and centrifuged for 15 min at 30,000 g at 4 °C.

The pelleted inclusion bodies were solubilized at 1 mg per 8 mL of TE-urea buffer (8 M urea, 50 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8). After incubation for at least 4 hours at 4 °C with gentle agitation, the soluble inclusion bodies were centrifuged for 30 min at 30,000 g. Supernatants were then dialyzed overnight at 4 °C against water (Spectra/Por Dialysis Membrane MWCO 3,500). After 1 hour of ultracentrifugation at 100,000 g at 4 °C, urea, Tris and EDTA were added to the supernatants at the following final concentrations: 8 M urea, 25 mM Tris pH 8, and 1 mM EDTA. The solution was passed through a Vivaspin® 20 centrifugal concentrator (MWCO 30,000). Flow-throughs were dialyzed overnight at 4 °C against water (Spectra/Por Dialysis Membrane MWCO 3,500). After 40 min of ultracentrifugation at 100,000 g at 4 °C, the supernatant was frozen in liquid nitrogen and lyophilized. The powder was solubilized in 500 μ L of TE-urea buffer. Monomers and oligomers of A β were separated by size-exclusion chromatography on a Superdex-75 10/300 GL Column. Column was equilibrated in phosphate-buffered saline (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.4) at 4°C. Column calibration was done by injecting 50 μ L of Gel Filtration Standard (Biorad). The monomeric and oligomeric A β

fractions were pooled separately, and aliquots were quantified with a Bradford assay, frozen in liquid nitrogen, and conserved at -80 °C until use.

Tht fluorescence assay:

Aliquots of monomeric or oligomeric A β were diluted to the appropriate final concentration (20 μ M or 30 μ M) in PBS. Each sample had a total volume of 100 μ L and contained 20 μ M thioflavin T dye. All kinetics measurements were carried out at 30 °C in 96-well plates. Data were recorded using a POLARstar Omega reader (BGM). Data points were recorded in cycles using the bottom-reading mode. A single cycle consisted of 10 s of orbital shaking (600 rpm) before fluorescence measurement, which was taken as the average of 10 flashes every 6 min. The dye was excited at 440 nm, and the fluorescence signal was recorded at 480 nm.

For cross-seeding assays, nucleation seeds were prepared from fibers obtained during the kinetics measurement described above. A 100 μ L aliquot of each sample was sonicated for 5 min (output 5 and 50 % duty cycle). A 2 μ L aliquot of sonicated fibers was added to 100 μ L of 20 μ M A β monomers or oligomers.

Bis-ANS fluorescence assays:

The oG₃₇CUR (50 μ M) was fractionated by SEC on a Superdex-75 column in PBS. Absorbance at 215 nm and fluorescence at 480 nm in the presence of 1 μ M bis-ANS were measured at t₀. At different times during incubation in PBS with 5 mM DTT, the fluorescence in the presence of 1 μ M bis-ANS was recorded. The dye was excited at 360 nm, and the fluorescence signal was recorded at 480 nm using an LS50B luminescence spectrometer (PERKIN ELMER).

Circular dichroism:

CD spectra were obtained in the far-UV region with a JASCO J810 spectropolarimeter. Samples were prepared as described above (see subsection Tht fluorescence assay) and then placed in a 0.1-cm pathlength quartz cuvette and monitored in continuous scan mode (260-190 nm). Data were averaged from 10 scans.

IR spectroscopy:

Fibrillation of A β was generated over 15 days, in conditions described above (see subsection Tht fluorescence assay).

Each sample (20 μ l) was loaded on a germanium ATR crystal (Specac, Orpington, UK) and dried with a stream of dry air. ATR-FTIR spectra were recorded on a Nicolet Nexus 870 FTIR spectrometer equipped with a mercury cadmium telluride detector (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) with a spectral resolution of 4 cm^{-1} and a one-level zero filling. One hundred interferograms, representing an acquisition time of 3.5 min, were co-added. For clarity, the maximum absorbance for the amide I band has been normalized to the same value for all spectra shown.

Transmission electron microscopy:

A 5 μ l aliquot of aggregates was adsorbed onto Formvar-coated, carbon-stabilized copper grids (200 mesh) for 10 min, washed 3 times with water, and dried with filter paper. Grids were then negatively stained with 10 μ L of 2 % uranyl acetate, dried with filter paper and observed with a Philips TECNAI 12 Biotwin electron microscope at 80 kV.

Cell culture and MTT assays:

PC12 cells were cultured in RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with 10 % horse serum, 5 % fetal bovine serum, 0.1 % penicillin, and 0.1 % streptomycin on poly-D-lysine (PDL)-coated dishes.

A β monomers were diluted to 20 μ M in PBS and incubated at 30 $^{\circ}$ C for 6 or 24 hours. G37C oligomers (oA β _{G37C}UR) were diluted to 20 μ M in PBS and incubated with 5 mM DTT at 30 $^{\circ}$ C for 6 or 24 hours.

The viability of PC12 cells was measured using the Cell Proliferation Kit I (MTT) from Roche. PC12 cells (40,000 cells/well in 80 μ L medium) were cultured on PDL-coated 96-well plates overnight. A β samples (20 μ L) aliquoted from the incubated A β samples and diluted to the appropriate A β concentration were added to the wells and incubated for 16 hours. The A β concentration in the cell culture medium was kept at 0.5 μ M. For control samples, the same volume of PBS was added to the wells. For the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reaction and measurement, the adsorption values at 550 nm were determined using a Tecan microplate reader. The viability of cells treated with PBS alone was set as 100%.

Statistical Analyses:

Data are expressed as means \pm S.D. Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance followed by unpaired Student's *t* test.

Results

Single mutants of A β ₄₂ dramatically alter A β toxicity.

The mutagenesis of A β yielded an average of 2.5 mutations per clone within the A β coding sequence, which is consistent with our previous experiments [18]. Among the 6,000 clones analyzed, 54 were clearly affected in their capacity to form normal colonies when A β was expressed, and the corresponding plasmids were sequenced. All the mutations are missense mutations (Supplementary Figure 1). The most toxic single mutants in yeast are shown in Figure 1 (panel A). These single mutations were located within residues 18-42, which form a β -strand (18-26)-turn- β -strand (31-42) “U-shape” motif, as determined by solid state NMR [20]. The toxicity induced by these different alleles of A β was estimated by a serial dilution assay (Fig.1, panel B). Interestingly, the selected mutants appeared to be much more toxic than the Arctic (E22G) mutation, which is itself slightly more toxic than the WT in our yeast model [17].

One mutant (E22K) was previously identified in an Italian familial case of Alzheimer’s disease [25]. *In vitro*, this mutation increases the rate of aggregation of synthetic A β ₄₂ [26]. These differences in toxicity (G37C > A30V > G33V > E22K > V40I > E22G > WT) could have been caused by different levels of expression of these A β species within the yeast cells. This trivial explanation was definitively ruled out by a Western blot experiment (Fig. 1, panel C). Interestingly, the ratios between the precursor, glycosylated, and mature forms remained roughly the same for the more toxic mutant G37C, indicating comparable secretion efficiencies, in G37C vs WT. Such a distribution would be expected to correspond to an equivalent distribution of the protein within different cellular compartments. This mutant (G37C) exhibited the same pattern of localization as the other non-toxic allele (I31T) tested (Fig. 1 Panel D). It is therefore clear that the toxicity of these new A β alleles was not due to a change in protein concentration or localization but rather to other parameters, such as its auto-assembly capacity.

In many cases, multiple mutations can be found within a mutagenized A β sequence. Interestingly, among the 135 single changes obtained, we never observed any mutations of V12, L34, or I31 (data not shown). This result could have been due to a non-random distribution of the mutations. Alternatively, it might indicate that these aminoacids are crucial for A β toxicity and that their mutation would be counter-selected in our screen (this screen was based on the gain of toxicity of A β). We tested this hypothesis and created point mutations at these three positions. Site-directed mutagenesis was performed using degenerate oligonucleotides for the different amino acids (V12, L34 and I31). After mutagenesis of the

V12 position, most of the clones obtained remained toxic, indicating that this aminoacid may be changed without a loss of toxicity (data not shown). In contrast, most of the L34 and I31 mutants were harmless. Sequence analysis of several clones revealed mutations in the first, second or third position within the codon (Fig. 1, panel E). In all cases (data not shown), these mutations were non-synonymous (i.e., they led to a change in the primary structure of the peptide). Even conservative mutations, such as isoleucine for leucine, caused a significant change in A β toxicity.

Because our screen produced both harmful and harmless mutations, we were interested to determine whether these mutations could act both in *cis* (the two mutations being in the same peptide) and in *trans* (the two single mutants are produced separately in the same yeast cell). The co-expression of toxic mutants and WT A β within the same yeast cell led to growth defects similar to those induced by the toxic mutant alone (data not shown). This dominant phenotype was also found when the harmless I31T and the harmful G37C mutant were co-expressed, demonstrating that non-toxic A β mutants could not prevent A β toxicity in *trans* (Fig. 1, panel F). When both mutations were made in the same A β protein, the double mutant was only slightly toxic, indicating that I31T and L34T prevent the formation of toxic species in *cis* (Fig. 1, panel G). This finding is consistent with the hypothesis of more than one A β folding pathway leading to different entities.

As such the combination of GFP, particularly with the small A β peptide may significantly bias the results of our screening. In our yeast expression system, we already know that expression of A β without GFP lead to a modest toxic effect [17], making any toxicity measurement rather tricky. This is probably due to the role of GFP that stabilizes A β and increase its cellular concentration [17]. However, when expressed in a euroscarf yeast strain selected for its increased sensitivity toward A β -GFP (Vignaud *et al.*, to be published), we could clearly observe and monitor growth impairment due to A β expression. Importantly, A β is not tagged in this experiment and we could confirm that A β _{G37C} is more toxic than E22G itself slightly more toxic than the WT (Fig. 1, panel h). These *in vivo* observations led us to further investigate the properties of these different A β peptides *in vitro*.

Polymerization rate and fibrillar organization of A β ₄₂ mutants

The different A β peptides were expressed in *E. coli* and further purified, the final step being a size exclusion chromatography. The peak of A β peptides eluted from the column as a monomeric species was flash-frozen. Different approaches may be used to follow A β assembly, and we used ThT binding because it allowed us to follow fibrillation kinetics in

real time. In this assay, all mutants (toxic E22G and G37C, harmless L34T and WT) exhibited the typical sigmoidal assembly curve (Fig. 2, panel A). The results were consistent with a nucleation-dependent polymerization process. At the same concentration (20 μ M), the lag time before the increase in fluorescence varied greatly among the mutants, from a few minutes (E22G) to several hours (G37C). This criterion was therefore not sufficient to predict the *in vivo* phenotype of each A β mutant (*i.e.*, the severity of the A β toxicity in yeast cells). This is also the case for other A β mutants. In particular, the D23N-A β ₄₀ Iowa mutant and E22Q Dutch mutant exhibit enhanced rates of fibril assembly compared with wild-type A β peptides [26]. Meanwhile, A21G Flemish A β ₄₀ exhibits a much slower assembly rate, comparable with that of wild-type A β [26].

At the same concentration and under the same experimental conditions (agitation, buffer, temperature, etc.), the different mutants plateaued at different levels. Similar differences in ThT fluorescence can be observed for one peptide when the experimental conditions vary [27] and may be explained by the proportion of the peptide that is able to auto-assemble and/or by structural variations in A β fibrils (indicating structural differences reminiscent of amyloid strain characteristics [28]). Such fibril characteristics can be passed on by seeding in a strain-like behavior [29]. The addition of fibril seeds (2 % sonicated L34T or G37C aggregates) to a solution of monomeric G37C shortened the lag time (Fig. 2, panel B). Interestingly, the level of fluorescence depended on the type of fibrils added for the seeding and echoed the fluorescence reached by monomeric solutions incubated without seeding. Strikingly, monomeric L34T assembly was not stimulated (or was stimulated very poorly) by the presence of sonicated G37C fibrils (Fig. 2, panel C), although it was stimulated normally by sonicated L34T aggregates (data not shown). This may indicate a low “seed” content in the G37C fibrils (leading to low ThT fluorescence) and/or a structural difference that created a “species barrier” [30].

We analyzed the structural changes at different times during the lag phase, the exponential increase, and the plateau, by circular dichroism (CD) spectroscopy. The CD spectra demonstrated a continuous decrease in the content of unordered (random coil) conformations and a concomitant increase in the content of β -structures (Fig. 2, panel C). The time course of this switch was consistent with the aggregation of A β variants, as estimated using the thioflavin T fluorescence assay. The intensity of the negative peak at 218 nm depended on the mutant analyzed (data not shown) but was not correlated with the ThT maximum value or A β toxicity in yeast. This lack of correlation may reflect a real property of amyloid fibrils formed by the different mutants. However, the measurement of the spectra

might have been slightly distorted, as the observed changes in the spectra were the result of conformational changes and simultaneous aggregation with the formation of higher, partially insoluble, aggregates.

The final aggregates were further characterized by ATR-FTIR and electronic microscopy. The analyses of the amide I region ($1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$) of the ATR-FTIR spectrum allowed us to identify the presence of parallel or anti-parallel β -sheets, and random coil organizations. The aggregates formed by the WT, L34T, and E22G mutants showed typical parallel β -sheet features, characterized by an absorbance maximum at 1630 cm^{-1} (Fig. 2, panel D). A parallel β -sheet organization exhibits two bands, the most intense at around 1630 cm^{-1} and a less intense at 1651 cm^{-1} , which was difficult to distinguish due to their overlap with random contributions [31,32]. This finding is consistent with the classical in-register parallel arrangement model based on NMR and site-directed spin labeling experiments [33,34]. The spectrum obtained with the G37C mutant was less conventional. The presence of a broad band indicates multiple contributions and can explain the lack of efficient cross-seeding with monomeric L34T mutant.

The ultrastructural organization of the aggregates was analyzed by electron microscopy of negatively stained samples. All the aggregates formed from the different A β peptides exhibited a typical fibrillar structure. The morphology of these fibrils resembled each other closely, as the fibrils that formed appeared to be quite similar at this level of resolution (Fig. 2, panel E).

All these results converge toward a puzzling result: harmful (E22G, WT) and harmless (L34T) A β_{42} behaved in the same way *in vitro*, and the most toxic mutant (G37C) formed also fibrils without clear identification of the parallel β -sheets organization. This lack of correlation between toxicity and molecular organization of the monomers was further supported by the viability test in cell culture. We examined the relative toxicity of each A β_{42} peptide using an MTT assay in PC12 cells (Fig. 2, panel F). Prior to their addition to the cell culture, the monomeric A β_{42} peptides were incubated for 0, 6, or 24 hours. The cells were then treated for 16 hours at a concentration of $0.5\text{ }\mu\text{M}$ A β in each cell well. At the end of this period, MTT reagent was added. The Arctic mutant was the most deleterious mutant, but, strikingly, the harmless L34T mutant appeared to be more toxic than the WT after 24 h, and the mutant that was the most toxic in yeast G37C was not more efficient than wt at reducing cellular viability in PC12 cells. Obviously, the results obtained *in vitro* with the purified monomeric fraction of the different A β_{42} peptides are not consistent with the *in vivo* data.

Toxic A β mutants accumulate oligomers

Because none of these experiments helped us to understand the molecular basis of A β toxicity, we decided to expand our analysis to the different species isolated during the last steps of our purification procedure. After ultrafiltration in the presence of urea, the flow-through was dialyzed against distilled water overnight. The corresponding protein was further lyophilized, dissolved in 8 M urea pH 8, and then filtered on a suitable SEC column to separate the A β monomers from the urea. All species formed a monomeric peak. Interestingly, the non-toxic isoforms (L34T and I31T) each exhibited only one peak, corresponding to the monomeric form (unfolded, unable to bind ThT), whereas the other mutants produced peaks corresponding to higher molecular weight species (Fig. 3, panel A). The ratio of the larger species peak to the monomeric peak was correlated with the toxicity of the isoform, with G37C exhibiting the highest ratio. Because this mutant was associated with the highest A β species content and was the most toxic, we focused our attention on this mutant. To rule out the possibility that these oligomers formed during the filtration, we repeated the separation in a buffer containing urea. When lyophilized protein resuspended in 8 M urea was loaded into a column equilibrated with PBS + 8 M urea and eluted with the same buffer, we again observed the same peak eluted in the same volume (data not shown). This indicated that the oligomers were generated during the dialysis and were not dissociated by 8 M urea. These oligomeric A β _{G37C} urea-resistant species were named oA β _{G37C}UR.

Cysteine may form disulfide bonds in proteins by oxidation, and these chemical links could stabilize a putative dimer or oligomer that could eventually incorporate the majority of G37C monomers. Such cross-linked intermediates would be resistant to urea and could explain the properties observed. We observed the same profile on Tricine-SDS-PAGE [35] in reducing (50 mM DTT, 50 mM TCEP or 2.5 % β mercaptoethanol) or non-reducing conditions (Fig. 3, panel B). The electrophoretic mobility was consistent with the formation of a trimer, but SDS-PAGE may induce the artifactual formation of high-molecular-weight A β assemblies [36,37]. Monomeric A β _{G37C} is mainly detected as a 4 kDa species but forms also higher species when loaded on SDS PAGE whatever reducing agent was added or not (Fig 3, panel B). However, because the SDS-PAGE profiles obtained with and without DTT were the same, the presence of a disulfide bond was very unlikely. To confirm this finding, we added DTT to the sample, equilibrated the gel filtration in PBS + DTT, and then loaded the oligomeric species onto the column. The presence of DTT did not change the elution profile, and the protein was found in the same fraction (Fig. 3, panel C), indicating that the interactions leading to the formation of oligomers do not involve disulfide bonds.

When incubated at 30°C under reducing conditions, these oA β _{G37C}UR formed structures that interacted specifically with ThT (Fig. 3, panel D). The kinetics of ThT binding were consistent with a model of nucleation-dependent polymerization, as is the case for monomeric peptides. This indicates that the oligomeric species purified at 4 °C (which do not bind ThT or bind poorly) can be converted into a different structure that could be either a different type of oligomer or a polymer resulting from its auto-assembly. Figure 3, panel E shows transmission electron microscopy (TEM) images of the structures formed during this kinetics assay. The species that bound ThT were clearly fibrillar. These fibrils assembled into large bundles of fibrils and seemed to interact laterally more efficiently than the fibrils made from monomeric proteins.

In sharp contrast with other fibrils, fibrils made with oA β _{G37C}UR always exhibited a strong capacity of assembly within the same plane. The capacities of these oligomeric species to bind ThT and to assemble into fibrillar structures resembled the auto-assembly mechanisms of the different monomers analyzed during this study. However, the FTIR spectra obtained from oligomeric oA β _{G37C}UR at t₀ and after auto-assembly were significantly different from those obtained from monomeric A β , indicating that these entities adopted different structures. At t₀, oligomeric species were mainly found as random coils. After the auto-assembly of the peptide, the amide I region in FTIR was characterized by the presence of the two characteristic peaks of anti-parallel β -sheet structures, at 1630 and 1695 cm⁻¹. This result indicates a switch from a random structure to an anti-parallel organization (Fig. 3, panel F). This transitional shift from random coils to organized structures was further confirmed by measuring the fluorescence of ANS. Bis-ANS and ANS bind to exposed hydrophobic clusters on protein surfaces, resulting in a blue-shifted emission maximum and a significantly enhanced emission intensity [38,39]. This shift provides an interesting tool with which to follow the folding of a protein [39] and can thus be used to monitor the structural changes during A β assembly. At t₀, oA β _{G37C}UR bound to ANS (Fig. 3, panel G), as would be expected for an unstructured organization. When incubated at 30°C under conditions allowing the formation of ThT-binding species, this fluorescence decreased, indicating the burial of previously exposed hydrophobic domains (Fig. 3, panel F).

The toxicity of these oligomers was then tested in PC12 mammalian cells. At t₀, these oligomers appeared to be more toxic than the unincubated A β _{G37C} (45 % vs 90 % viability) (Fig. 3, panel H). The same results were observed after 24 hours of incubation (Fig. 3, panel H).

Discussion

The identification of the toxic species of A β is the Holy Grail for many scientists in the field of A β research. One of the difficulties these researchers face comes from the different tools used to track these elusive objects. Many different biochemical approaches have identified the existence of different amyloid intermediates, such as oligomers, protofibrils and annular aggregates [14,40]. These species are difficult to analyze because most of them are in equilibrium and in a metastable state that can be converted into a more stable organization. In addition to this intrinsic complexity, the most popular toxicity assay, based on the measurement of cell viability in the presence of A β , adds a level of complexity due to the effects of the cell culture medium, which can change the properties of A β species after several hours in culture. The best example of such interactions comes from the protocol used to isolate A β -derived diffusible ligands (ADDLs), which involves the incubation of A β in F12 medium [41,42]. It is therefore difficult to make an unambiguous connection between *in vitro* and *in vivo* properties. Here, we used a reverse method based on a simple eukaryotic model to measure the toxicity of A β *in vivo*. These yeast cells, although not as complex as mammalian cells, are suitable for the study of amyloid properties such as prionization [43] and toxicity (for a review, see [44]). We predicted that the *in vitro* study of mutants selected for various levels of toxicity could reveal a type of biochemical signature that would explain the differences in their properties.

Purified A β ₄₂ monomers assemble into distinct fibrillar structures in vitro.

We were able to isolate monomeric A β via size-exclusion chromatography for all the different A β peptides. These monomeric peptides, except that of the most toxic species (G37C), assembled into classical amyloid fibrils with high parallel β -sheet contents. The G37C mutant also formed fibrillar structures that were able to bind the thioflavin, but the ATR-FTIR spectrum indicated the presence of different structural states, leading to a broad amide I band. Interestingly, G37C fibrils could not seed L34T assembly, whereas the opposite scenario (fibrils of L34T in the presence of monomeric G37C) seeded assembly efficiently. We hypothesized that L34T can form aggregates that can also incorporate G37C (represented by a blue triangle in Figure 4, panel A). In this model, the G37C mutant spontaneously assembles with a low efficiency into this structure and mainly forms a different type of aggregate (red arrow) that cannot be formed with the L34T mutant. Interestingly, WT A β and E22G were efficiently cross-seeded with G37C and L34T fibrils (data not shown), indicating their ability to form both types of aggregate (Fig. 4, panel A).

Strikingly, monomeric G37C (isolated for its high toxicity in yeast cells) was less toxic than the other peptides when added to cultured cells. In the same assay, the harmless L34T mutant appeared to be much more toxic at 24 h than the WT-A β ₄₂. Interestingly, this toxicity increased during fibril formation and the acquisition of the β -sheet signature. These results contradict the *in vivo* analyses in yeast and may reflect a shortcoming of the cell assay, the yeast system used or both. Adding A β to cell culture presents some bias [45] and does not reflect the complexity of the mechanisms in brain tissue. It might also be different from the toxicity of A β formed within the cell. Obviously, yeast cells are not identical to neurons, but they can faithfully reproduce some of the events associated with intracellular toxicity, such as the interaction of A β with molecular chaperones. Regardless, there is no obvious link between the auto-assembly of the different monomeric species and cellular toxicity (monitored *in vitro* in cell culture by adding the peptides, or indicated by yeast viability during their intracellular production). This result suggests that most of the A β toxicity relies on a different property.

Urea-resistant oligomers are a hallmark of toxic mutants

During our study, we discovered that A β ₄₂ was able to form oligomeric species during the slow removal of urea by dialysis. The slow and gradual removal of the urea often allowed the protein to refold, mimicking the function of molecular chaperones that can assist A β folding *in vivo*. All but the two harmless mutants were able to form oligomers. These oligomers could further assemble into a β -sheet with anti-parallel organization. In a previous study, we also found that toxic mutants of the amyloid domain of Het-s display a characteristic anti-parallel structure in FTIR [19,32]. In the last 5 years, compelling evidences have shown that antiparallel amyloid structures were found in oligomers and to a lesser extend in certain fibrils. Remarkably, anti-paralleled organization was already evidenced for the IOWA (D23N) variant of A β ₄₀, isolated as familial Alzheimer disease mutation [46]. The key point is that lot of these antiparallel structures were also correlated to toxicity [47]. The anti-parallel organization should favor fibril fragmentation, which in turn should result in the formation of smaller aggregates that would be more deleterious to cell viability, similar to the fibril fragments formed by mechanical treatment [48].

A β ₄₂ oligomers are able to form anti-parallel β -sheet structures [49,50], and these oligomers are assumed to be intermediates in the pathway toward parallel β -sheet fibril formation. However, no structural data can explain the formation of these species at the molecular level. The recent crystal structure of the A β ₁₈₋₄₁ fragment inserted into a single

variable-chain immunoglobulin loop shows a tetrameric arrangement based on anti-parallel β -sheets[51]. Interestingly, the two amino acids that are essential for A β toxicity (L34 and I31) are also critical for this A β packing. In particular, the four Leu34 side chains form a hydrophobic clamp, and a mutation of Leu34 would disrupt the central hydrophobic core of the tetramer and break the β -sheets formed between adjacent dimers [51]. In this model, the two Ile31 side chains form a hydrophobic pocket that is essential for the formation of each dimer, and a mutation in Ile31 would thus lead to the inability to fold in this way. The essential roles of these two amino acids (Leu34 and Ile 31) in the anti-parallel packing of A β are similar to their essential roles in forming toxic A β . This correlation suggests that this folding may be somehow related to the formation of toxic species in a pathway that is clearly different from the auto-assembly pathway leading to parallel U-shape β -sheet fibrils. This pathway evokes the structural organization of cylindrin, a toxic oligomer that can also pack into an out-of-register fibril that is toxic to mammalian cells [52].

These two pathways, if they exist in living cells, may contribute differently to A β toxicity (Fig. 4, panel B). Interestingly, the cytotoxicity of the urea-resistant G37C oligomer against culture cell was higher than monomeric unincubated G37C or WT. Thus it is plausible that such toxic oligomers, if produced in yeast, may partially explain the different toxic property of G37C mutant. The incapacity for L34T mutant to form such entities would also explain its lack of cellular toxicity.

In summary, our structure-toxicity study of A β has identified new biological and structural aspects of A β folding. First, we demonstrated that toxic and non-toxic A β_{42} monomers assemble into different types of fibrils. These fibrils are comparable to classical amyloid fibrils in terms of their fibrillar morphology, ThT binding ability, and β -strand contents but differ in their capacity to seed the auto-assembly of the different A β_{42} monomers.

Second, we identified a new type of oligomer that is formed during urea removal by dialysis. The presence of this oligomer is related to the toxic properties of A β mutant peptides. The aminoacids crucial for the formation of these oligomers are also crucial for the formation of anti-parallel structures previously identified by other in an independent structural study.

Third, we have shown that these oligomers have the capacity to form fibrils that are rich in anti-parallel β -sheets and are different from the fibrils made *in vitro* from monomeric A β . Our findings emphasize the role of a new, unidentified factor in amyloid toxicity and the need to revisit the pathologically relevant factors in Alzheimer's disease.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the PEPS IDEX 2012 « Analyse structure-toxicité du peptide A β impliqué dans l'apparition de la maladie d'Alzheimer » and by JSPS KAKENHI (No. 24570143) and RIKEN.

Abbreviation used TEM, Transmission Electron Microscopy; ATR-FTIR, Attenuated Total Reflectance Fourier-Transformed Infra-Red, ThT Thioflavine T ; A β , amyloid beta

References :

1. Kenney JM, Knight D, Wise MJ, Vollrath F (2002) Amyloidogenic nature of spider silk. *Eur J Biochem* 269: 4159–4163.
2. Wickner RB (1994) [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 264: 566–569.
3. Chiti F, Dobson CM (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* 75: 333–366. doi:10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901.
4. Fowler DM, Koulov AV, Balch WE, Kelly JW (2007) Functional amyloid--from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci* 32: 217–224. doi:10.1016/j.tibs.2007.03.003.
5. Maji SK, Perrin MH, Sawaya MR, Jessberger S, Vadodaria K, et al. (2009) Functional Amyloids As Natural Storage of Peptide Hormones in Pituitary Secretory Granules. *Science* 325: 328–332. doi:10.1126/science.1173155.
6. Jan A, Hartley DM, Lashuel HA (2010) Preparation and characterization of toxic Abeta aggregates for structural and functional studies in Alzheimer's disease research. *Nat Protoc* 5: 1186–1209. doi:10.1038/nprot.2010.72.
7. Kaye R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, et al. (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300: 486–489. doi:10.1126/science.1079469.
8. Bucciantini M, Giannoni E, Chiti F, Baroni F, Formigli L, et al. (2002) Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* 416: 507–511. doi:10.1038/416507a.
9. Caughey B, Lansbury PT (2003) Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* 26: 267–298. doi:10.1146/annurev.neuro.26.010302.081142.
10. Hardy J, Allsop D (1991) Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12: 383–388.
11. Hardy J (2006) Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis: An update and reappraisal. *JAD* 9: 151–153.
12. Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, et al. (2001) The "Arctic" APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat Neurosci* 4: 887–893. doi:10.1038/nn0901-887.
13. Lashuel HA, Hartley DM, Petre BM, Wall JS, Simon MN, et al. (2003) Mixtures of wild-type and a pathogenic (E22G) form of Abeta40 in vitro accumulate protofibrils, including amyloid pores. *J Mol Biol* 332: 795–808.
14. Broersen K, Rousseau F, Schymkowitz J (2010) The culprit behind amyloid beta peptide related neurotoxicity in Alzheimer's disease: oligomer size or conformation? *Alzheimers Res Ther* 2: 12. doi:10.1186/alzrt36.
15. Fändrich M (2012) Oligomeric intermediates in amyloid formation: structure determination and mechanisms of toxicity. *J Mol Biol* 421: 427–440. doi:10.1016/j.jmb.2012.01.006.
16. State of aggregation (2011). *Nat Neurosci* 14: 399. doi:10.1038/nn0411-399.
17. D'Angelo F, Vignaud H, Di Martino J, Salin B, Devin A, et al. (2013) A yeast model for amyloid- β aggregation exemplifies the role of membrane trafficking and PICALM in cytotoxicity. *Dis Model Mech* 6: 206–216. doi:10.1242/dmm.010108.
18. Couthouis J, Rébora K, Immel F, Berthelot K, Castroviejo M, et al. (2009) Screening for Toxic Amyloid in Yeast Exemplifies the Role of Alternative Pathway Responsible for Cytotoxicity. *PLoS ONE* 4: e4539. doi:10.1371/journal.pone.0004539.
19. Berthelot K, Immel F, Géan J, Lecomte S, Oda R, et al. (2009) Driving amyloid

- toxicity in a yeast model by structural changes: a molecular approach. *FASEB J* 23: 2254–2263. doi:10.1096/fj.08-125724.
20. Lührs T, Ritter C, Adrian M, Riek-Loher D, Bohrmann B, et al. (2005) 3D structure of Alzheimer's amyloid- β (1–42) fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 17342–17347.
 21. Cullin C, Minvielle-Sebastia L (1994) Multipurpose vectors designed for the fast generation of N- or C-terminal epitope-tagged proteins. *Yeast* 10: 105–112. doi:10.1002/yea.320100110.
 22. Bonneaud N, Ozier-Kalogeropoulos O, Li GY, Labouesse M, Minvielle-Sebastia L, et al. (1991) A family of low and high copy replicative, integrative and single-stranded *S. cerevisiae*/*E. coli* shuttle vectors. *Yeast* 7: 609–615. doi:10.1002/yea.320070609.
 23. Walsh DM, Thulin E, Minogue AM, Gustavsson N, Pang E, et al. (2009) A facile method for expression and purification of the Alzheimer's disease-associated amyloid beta-peptide. *FEBS J* 276: 1266–1281. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06862.x.
 24. Studier FW (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 41: 207–234.
 25. Miravalle L, Tokuda T, Chiarle R, Giaccone G, Bugiani O, et al. (2000) Substitutions at Codon 22 of Alzheimer's A β Peptide Induce Diverse Conformational Changes and Apoptotic Effects in Human Cerebral Endothelial Cells. *J Biol Chem* 275: 27110–27116. doi:10.1074/jbc.M003154200.
 26. Murakami K, Irie K, Morimoto A, Ohigashi H, Shindo M, et al. (2003) Neurotoxicity and Physicochemical Properties of A β Mutant Peptides from Cerebral Amyloid Angiopathy. *J Biol Chem* 278: 46179–46187. doi:10.1074/jbc.M301874200.
 27. Qiang W, Yau W-M, Tycko R (2011) Structural Evolution of Iowa Mutant β -Amyloid Fibrils from Polymorphic to Homogeneous States under Repeated Seeded Growth. *J Am Chem Soc* 133: 4018–4029. doi:10.1021/ja109679q.
 28. Kodali R, Williams AD, Chemuru S, Wetzel R (2010) A β (1–40) Forms Five Distinct Amyloid Structures whose β -Sheet Contents and Fibril Stabilities Are Correlated. *J Mol Biol* 401: 503–517. doi:10.1016/j.jmb.2010.06.023.
 29. Petkova AT, Leapman RD, Guo Z, Yau W-M, Mattson MP, et al. (2005) Self-Propagating, Molecular-Level Polymorphism in Alzheimer's β -Amyloid Fibrils. *Science* 307: 262–265. doi:10.1126/science.1105850.
 30. Baskakov IV (2009) Switching in amyloid structure within individual fibrils: Implication for strain adaptation, species barrier and strain classification. *FEBS Letters* 583: 2618–2622. doi:10.1016/j.febslet.2009.05.044.
 31. Chirgadze YN, Nevskaya NA (1976) Infrared spectra and resonance interaction of amide-I vibration of the parallel-chain pleated sheets. *Biopolymers* 15: 627–636. doi:10.1002/bip.1976.360150403.
 32. Berthelot K, Ta HP, Géan J, Lecomte S, Cullin C (2011) In vivo and in vitro Analyses of Toxic Mutants of HET-s: FTIR Antiparallel Signature Correlates with Amyloid Toxicity. *J Mol Biol* 412: 137–152.
 33. Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, et al. (2002) A structural model for Alzheimer's β -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16742–16747. doi:10.1073/pnas.262663499.
 34. Török M, Milton S, Kaye R, Wu P, McIntire T, et al. (2002) Structural and Dynamic Features of Alzheimer's A β Peptide in Amyloid Fibrils Studied by Site-directed Spin Labeling. *J Biol Chem* 277: 40810–40815. doi:10.1074/jbc.M205659200.
 35. Schägger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166: 368–379.
 36. Bernstein SL, Dupuis NF, Lazo ND, Wyttenbach T, Condrón MM, et al. (2009)

- Amyloid- β protein oligomerization and the importance of tetramers and dodecamers in the aetiology of Alzheimer's disease. *Nat Chem* 1: 326–331. doi:10.1038/nchem.247.
37. Bitan G, Fradinger EA, Spring SM, Teplow DB (2005) Neurotoxic protein oligomers—what you see is not always what you get. *Amyloid* 12: 88–95. doi:10.1080/13506120500106958.
 38. Brand L, Gohlke JR (1972) Fluorescence probes for structure. *Annu Rev Biochem* 41: 843–868. doi:10.1146/annurev.bi.41.070172.004211.
 39. Engelhard M, Evans PA (1995) Kinetics of interaction of partially folded proteins with a hydrophobic dye: evidence that molten globule character is maximal in early folding intermediates. *Protein Sci* 4: 1553–1562. doi:10.1002/pro.5560040813.
 40. Haass C, Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 101–112. doi:10.1038/nrm2101.
 41. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, et al. (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6448–6453.
 42. Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, Baker LK, Krafft GA, et al. (2002) Oligomeric and Fibrillar Species of Amyloid- β Peptides Differentially Affect Neuronal Viability. *J Biol Chem* 277: 32046–32053. doi:10.1074/jbc.M201750200.
 43. Bach S, Talarek N, Andrieu T, Vierfond J-M, Mettey Y, et al. (2003) Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol* 21: 1075–1081. doi:10.1038/nbt855.
 44. Khurana V, Lindquist S (2010) Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast? *Nat Rev Neurosci* 11: 436–449. doi:10.1038/nrn2809.
 45. Röncke R, Klemm A, Meinhardt J, Schröder UH, Fändrich M, et al. (2008) A β Mediated Diminution of MTT Reduction—An Artefact of Single Cell Culture? *PLoS ONE* 3: e3236. doi:10.1371/journal.pone.0003236.
 46. Qiang W, Yau W-M, Luo Y, Mattson MP, Tycko R (2012) Antiparallel β -sheet architecture in Iowa-mutant β -amyloid fibrils. *PNAS* 109: 4443–4448. doi:10.1073/pnas.1111305109.
 47. Berthelot K, Cullin C, Lecomte S (2013) What does make an amyloid toxic: Morphology, structure or interaction with membrane? *Biochimie* 95: 12–19. doi:10.1016/j.biochi.2012.07.011.
 48. Xue W-F, Hellewell AL, Gosal WS, Homans SW, Hewitt EW, et al. (2009) Fibril fragmentation enhances amyloid cytotoxicity. *J Biol Chem* 284: 34272–34282. doi:10.1074/jbc.M109.049809.
 49. Habicht G, Haupt C, Friedrich RP, Hortschansky P, Sachse C, et al. (2007) Directed selection of a conformational antibody domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing A β protofibrils. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 19232–19237. doi:10.1073/pnas.0703793104.
 50. Cerf E, Sarroukh R, Tamamizu-Kato S, Breydo L, Derclaye S, et al. (2009) Antiparallel β -sheet: a signature structure of the oligomeric amyloid β -peptide. *Biochem J* 421: 415–423. doi:10.1042/BJ20090379.
 51. Streltsov VA, Varghese JN, Masters CL, Nuttall SD (2011) Crystal Structure of the Amyloid- β p3 Fragment Provides a Model for Oligomer Formation in Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 31: 1419–1426. doi:10.1523/JNEUROSCI.4259-10.2011.
 52. Liu C, Zhao M, Jiang L, Cheng P-N, Park J, et al. (2012) Out-of-register β -sheets suggest a pathway to toxic amyloid aggregates. *PNAS* 109: 20913–20918. doi:10.1073/pnas.1218792109.

Figure Legends

Table I : List of primers.

Figure 1: Cellular characterization of A β ₄₂ mutants selected for their toxicity

A: Peptide sequences of A β alleles.

Amino acid substitutions in mutated alleles are shown at the top. The number of asterisks (*) is proportional to their toxicity in yeast. Non-toxic mutations are boxed in red.

B: Comparison of the toxicities of A β alleles in yeast.

BY4742 cells carrying various plasmids were serially diluted and spotted on galactose (inducing) and dextrose (non-inducing) media. Cell growth was observed after 48h.

C: Expression of mutated A β .

BY4742 WT cells expressing the highly toxic A β alleles after 6 hours of induction were collected to extract total protein. Equal quantities of protein were separated by SDS-PAGE (12%), transferred to nitrocellulose membranes, and probed with an anti-A β antibody (Santa-Cruz Biotechnology). The bands correspond to the precursor (P), glycosylated (G) and mature (M) forms.

D: Aggregation patterns of GFP-tagged A β alleles in WT yeast.

WT cells were grown for 6 h in galactose medium to induce the expression of chimeric proteins and were examined by epifluorescence microscopy.

E: Ile31 and Leu34 are essential for A β toxicity.

Site-directed mutagenesis of Ile31 and Leu34 was performed with degenerate primers. The resulting harmless mutants were sequenced. The nucleotide substitutions and the corresponding changes in amino acids are shown.

F: Harmless mutations do not prevent toxicity in *trans*.

BY4742 WT cells co-transformed by the indicated plasmids were serially diluted and spotted on inducing and non-inducing media. Growth was observed after 72 h.

G: Harmless mutations prevent toxicity in *cis*.

BY4742 WT cells transformed by the A β double mutant were serially diluted and spotted on inducing and non-inducing media. Growth was observed after 48 h.

H: A β mutants are toxic without GFP.

BY4742 deleted for a gene involved in A β -GFP toxicity and carrying different alleles of A β without GFP were serially diluted and spotted on galactose (inducing) and dextrose (non-inducing) media. Cell growth was observed after 48 h.

Figure 2: Auto-assembly of purified monomers

A: Fibrillation of A β peptides monitored by ThT.

Monomeric A β_{WT} (orange), A β_{E22G} (blue), A β_{G37C} (red), or non-toxic A β_{L34T} (green) peptides (20 μ M) were incubated at 30 °C with 20 μ M ThT in PBS. Background signal (dashed black), 20 μ M ThT in PBS.

B: Cross-seeding of monomeric A β_{G37C} and A β_{L34T} .

Left, 30 μ M monomeric A β_{G37C} alone (orange) or seeded with 2 % sonicated A β_{G37C} (purple) or A β_{L34T} (blue) fibers was incubated at 30 °C in 20 μ M ThT. Right, 30 μ M monomeric A β_{L34T} with (light green) or without 2 % sonicated A β_{G37C} fibers (dark green) was incubated under the same conditions.

C: Structural changes in A β_{E22G} monitored by CD spectroscopy.

Far-UV spectra of A β_{E22G} (20 μ M) recorded at different times at 30 °C.

D: ATR-FTIR spectra of A β_{42} .

Spectra of A β_{wt} (orange), A β_{E22G} (blue), A β_{L34T} (green) and A β_{G37C} (red) (20 μ M) were recorded after 15 days at 30 °C (all normalized to 1).

E: Morphology of A β fibers.

During auto-assembly followed by ThT exposure, an aliquot of each peptide from the assembly plateau stage was negatively stained with 2 % uranyl acetate, loaded onto a coated grill, and analyzed by TEM. Scale bars: 200 nm.

F: Toxicity of A β variants in PC12 cells.

At various times (0, 6 and 24 h) during fibrillation in PBS at 30 °C, 0.5 μ M of each mutant A β was added to the medium. After 16 hours, cell viability was measured with MTT assays. The cell viability of cell treated with PBS was set as 100 %. The values represent the mean+S.D. of three experiments, plotted as solid bars (white, light gray, and dark gray for 0, 6, and 24 hours, respectively). ***p<0.001 compared with WT-A β_{42}

Figure 3: Isolation and characterization of G37C oligomers

A: Toxic A β forms DTT resistant oligomers during purification.

After dialysis, different species were eluted from a Superdex-75 column in PBS at 4 °C. Toxic A β _{G37C} (red) and harmless A β _{L34T} (green) were found in one or two peaks detected at 215 nm. The presence of DTT (5 mM) to the purified oligomeric fraction do not change its elution profile from a Superdex-75 column equilibrated in PBS + DTT (blue),

B: Elution profile of Standards on the Superdex-75 column in PBS at 4 °C.

C: Oligomeric urea-resistant A β _{G37C} (oA β _{G37C}UR) is not stabilized by S-S bonds.

Equal quantities of oA β _{G37C}UR (0.5 moles) were analyzed by Tricine-SDS-PAGE (15 %) under reducing (50 mM DTT or 50 mM TCEP or 2.5 % β mercaptotethanol) or non-reducing (-) conditions. The same analysis was done for A β _{G37C} with DTT and β mercaptoethanol as reducing agent.

D: Fibrillation of oA β _{G37C}UR monitored by ThT fluorescence.

80 μ M oA β _{G37C}UR was incubated with 20 μ M ThT at 30 °C.

E: Morphology of oA β _{G37C}UR fibers in TEM.

After 7 days of fibrillation at 30 °C, oA β _{G37C}UR was stained with 2 % uranyl acetate and observed by TEM. Scale bar: 200 nm.

F: oA β _{G37C}UR exhibits rich beta-parallel sheet structure in ATR-FTIR.

ATR-FTIR spectrum of oA β _{G37C}UR at t₀ (black) and after 15 days at 30 °C (red).

G: Conformational changes in oA β _{G37C}UR during fibrillation in bis-ANS.

50 μ M oA β _{G37C}UR was loaded onto a Superdex-75 column in PBS. Left, the absorbance at 215 nm (red) and fluorescence in the presence of 1 μ M bis-ANS (black) of oA β _{G37C}UR loaded at t₀. At different times during incubation at 30 °C in PBS + 5mM DTT, aliquots were taken for bis-ANS fluorescence analysis (right).

H: Toxicity of oA β _{G37C}UR in PC12 cells.

The cytotoxicity of oligomeric oA β _{G37C}UR in PC12 cells was determined with MTT assay. At time 0 (white) and after 24 hours of incubation in PBS (+ 5 mM DTT for oA β _{G37C}UR) (black), 0.5 μ M of A β _{G37C} or oA β _{G37C}UR was added to PC12 cells. After 16 hours, cell viability was measured with MTT assays. The cell viability of cell treated with PBS was set as 100%. The values shown indicate the mean+S.D. of three experiments. ***p<0.001

Figure 4: A working and hypothetical model of a dual fibrillar pathway

A: Purified monomers of non-toxic L34T form the only type of aggregate (represented as blue triangles) that can seed the fibrillation of all the peptides tested. The toxic G37C mutant

preferentially forms a different fibrillar structure (red arrow) that can seed the aggregation of WT and the E22G mutant, but not L34T.

This structure is stabilized by the G37C and E22G mutations and requires a particular folding environment, such as the slow removal of urea. The capacity to form these oligomers, which is the hallmark of toxic A β mutants, leads to the further assembly into anti-parallel β -sheet fibrils (**B**), which is a novel pathway.

Supplementary Figure 1: Toxic A β mutants in yeast

The mutated residues are framed in black.

N°	Sequence
705	5'-GGATGGCCAGGCAACTTTAG-3'
706	5'-TTTACACTTTATGCTTCCGG-3'
861	5'-GTGACCATTAACATCACC-3'
866	5'-GAGGCTGAAGCTGCAGCTGGTATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTC-3'
867	5'-CTTCACCTTTAGACATACCAGCTGCAGCTTCAGCCTCTCTTTTATC-3'
879	GCGAATTCCTTAGGTTACGCTATGACAACACCGC-3'
902	5'-TATTGCCAGCATTGCTGC-3'
960	5'AGTAGAGACATGGGAGATCCCCGCGAATTCCTTAGGTTACGCTATGACAACACCG-3'
980	5'-CCGACATGACTCAGGATATGAAnnnCATCATCAAAAATTGGTG-3'
981	5'-CACCAATTTTTGATGATGnnnTTCATATCCTGAGTCATGTCCG-3'
984	5'-GTGGGTTCAAACAAAGGTGCAAnnnATTGGACTCATGGTGGG-3'
985	5'-CCCACCATGAGTCCAATnnnTGCACCTTTGTTTGAACCCAC-3'
986	5'-CAAAGGTGCAATCATTGGAAnnnATGGTGGGCGGTGTTGTCATAG-3'
987	5'-CTATGACAACACCGCCCACCATnnnTCCAATGATTGCACCTTTG-3'
939	5'-CATCGGTCTGATGGTTTGCGGCGTTGTGATCGCTTAATAGG-3'
940	5'CCTATTAAGCGATCACAACGCCGCAAACCATCAGACCGATG-3'
978	5'GAAGCTGGTGTCTTGCTGGTGACGTGGGTTCTAACAAGGG-3'
979	5'CCCTTGTTAGAACCCACGTCACCAGCAAGAACACCAGCTTC-3'
1008	5'-CGATCACAACGCCACCAACCATGGTACCGATGATAGCACC-3'
1009	5'-GGTGCTATCATCGGTACCATGGTTGGTGGCGTTGTGATCG-3'

Figure 1

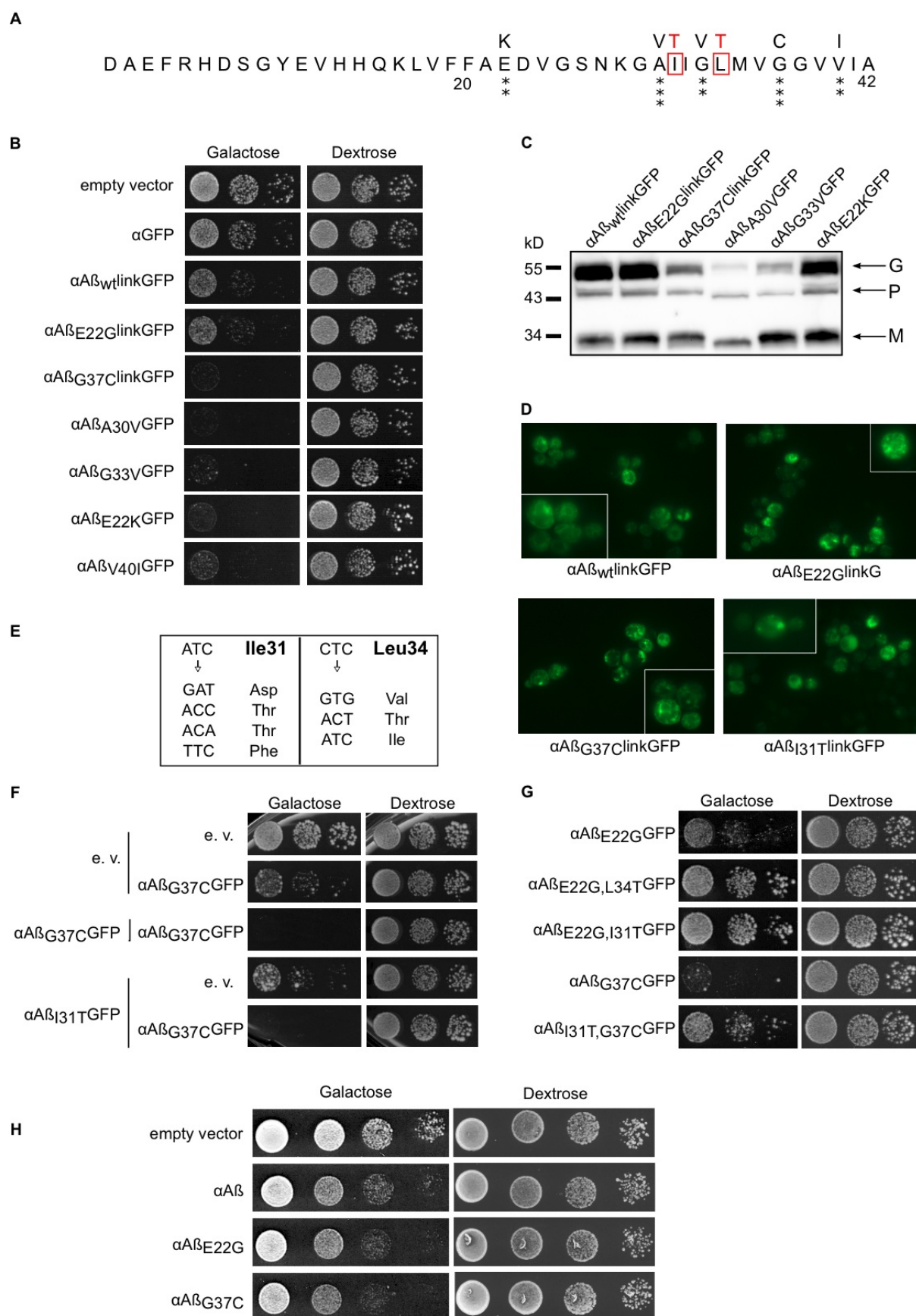


Figure 2

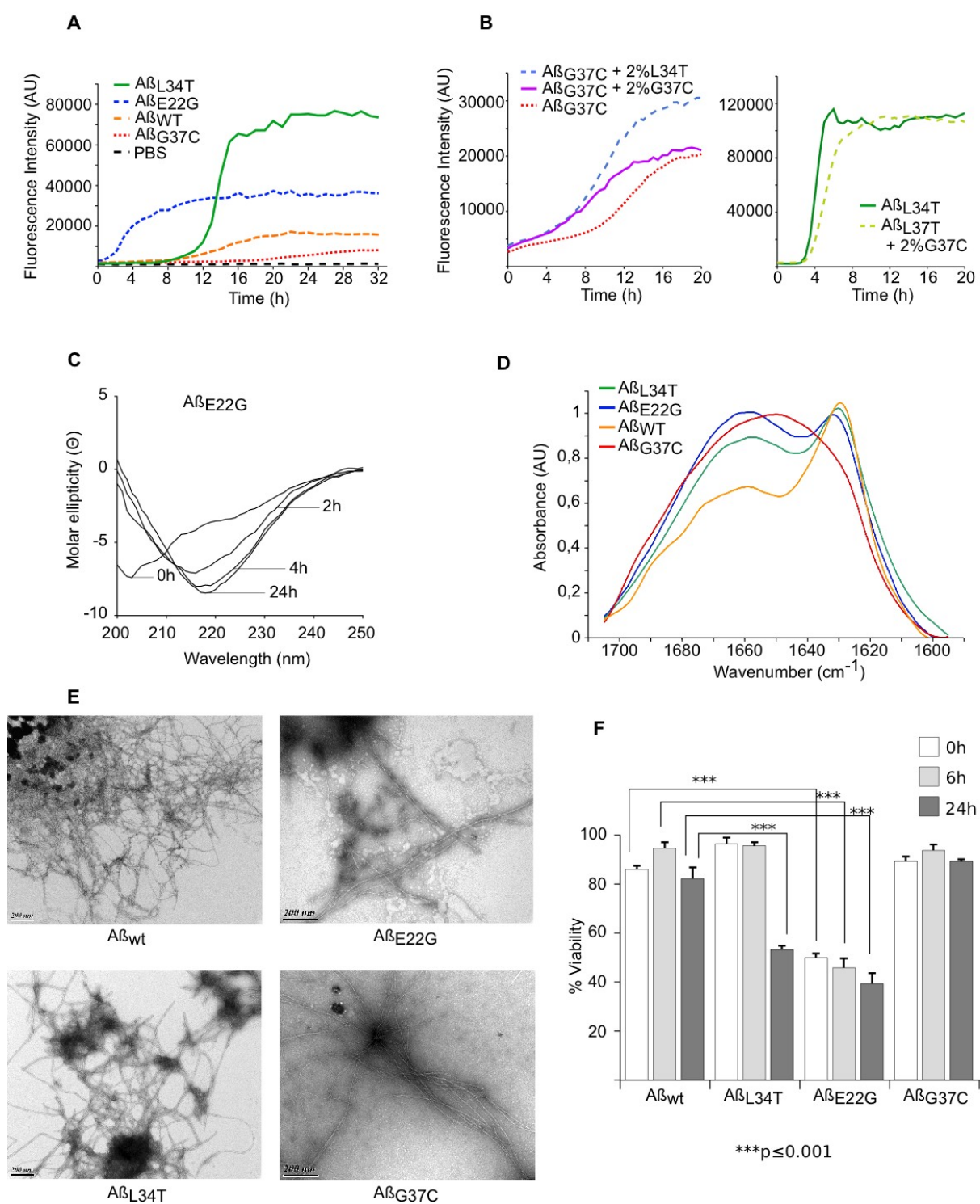


Figure 3

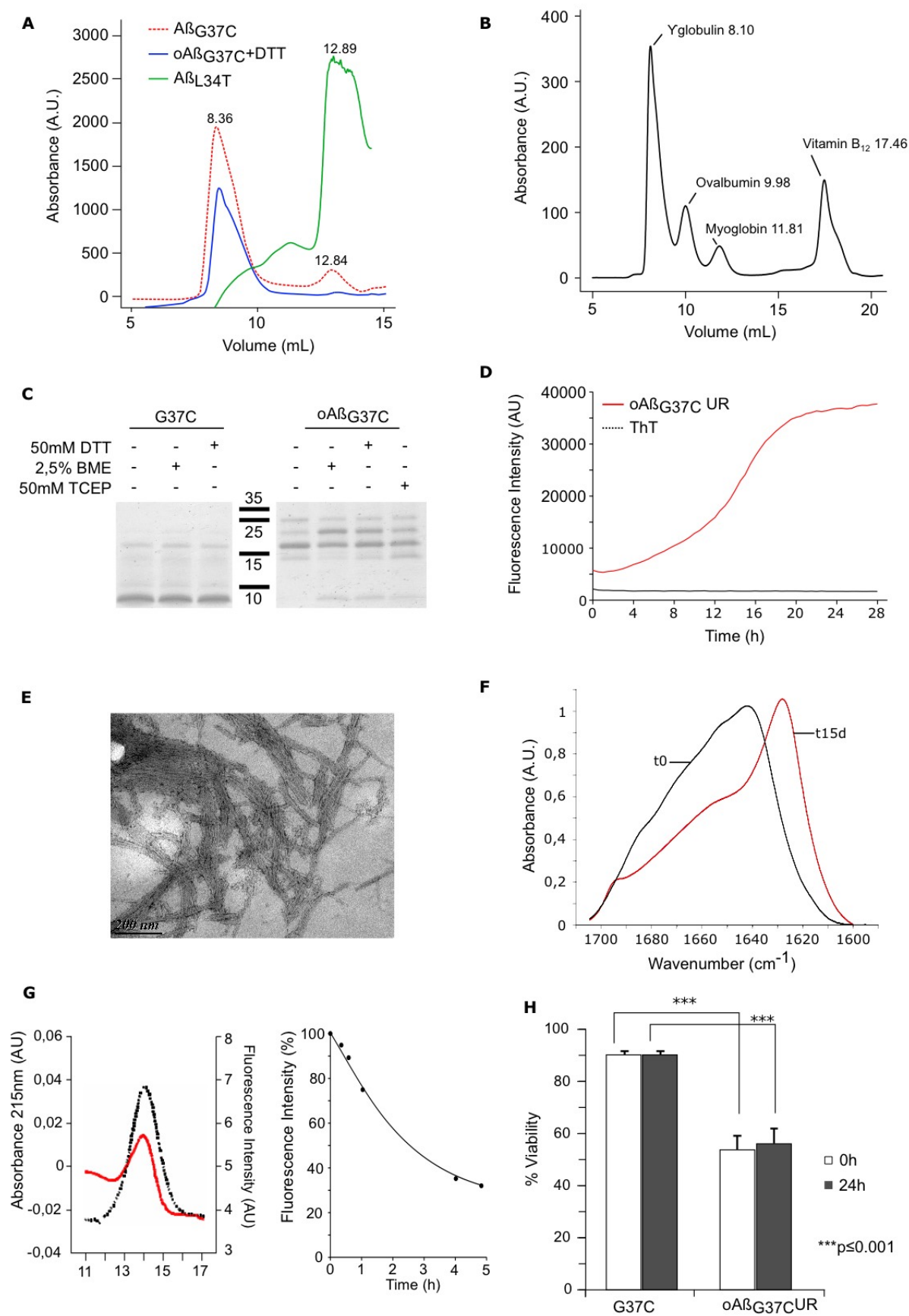
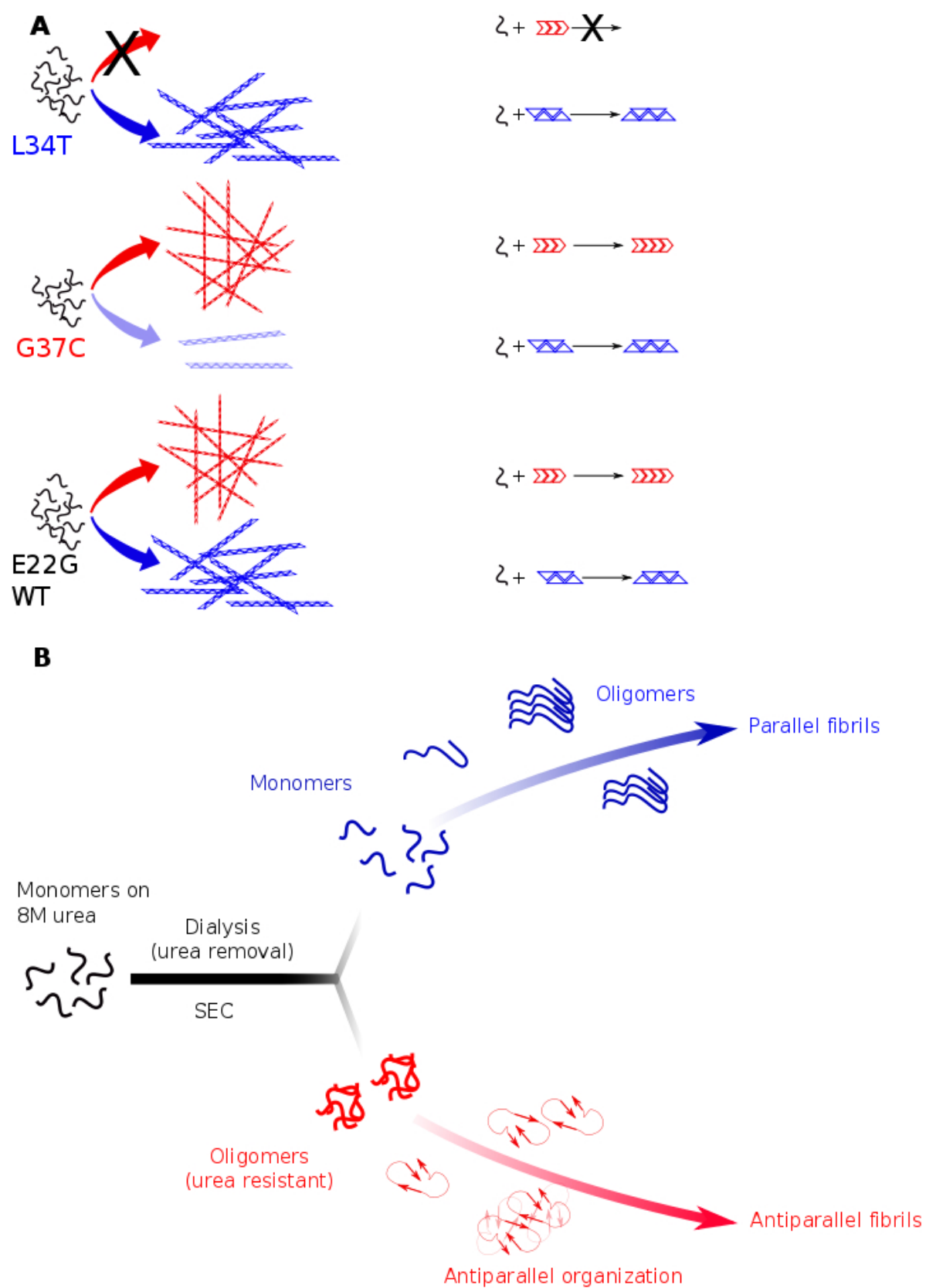


Figure 4



Supplementary Figure 1

WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
D	D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	K	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
V	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	H	Q	K	L	V	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
E	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	L	H	Q	K	L	V	F	F	A	V	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	C	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	Q	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	K	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	V	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	K	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V	I	A
D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H	H	Q	K	L	V	F	F	A</																					

II.C. Résultats complémentaires de l'article 2

Nous avons pu créer grâce au modèle de toxicité d'A β des variants hypertoxiques d'A β . Une limite à ce travail se trouve dans l'utilisation de la GFP. En effet, la GFP est presque six fois plus grosse qu'A β . Dans notre modèle, l'expression d' α A β sans GFP induit une très faible toxicité, contrairement à α A β GFP qui induit une toxicité franche. Il en est de même pour A β_{arc} et A β_{G37C} . Il a été établi que la présence de la GFP stabilise A β , que l'on retrouve alors en plus grande quantité.

D'autre part, on peut soupçonner que la présence de la GFP modifie le repliement d'A β . Les analyses *in vitro* effectuées sur le peptide seul pourraient, par conséquent, ne pas être représentatives de la situation *in vivo*. Nous avons donc réalisé la même recherche de mutants d'A β toxiques par mutagenèse aléatoire sur α A β sans GFP.

La mutagenèse a été effectuée par PCR mutagénisante, dans les conditions décrites précédemment, en utilisant les amorces 902 et 546 (Tableau 5) sur le plasmide pYeo α A β 2U. Les fragments amplifiés ont été intégrés par recombinaison homologue dans le plasmide pYeo α -*PvuII*-GFP 2U linéarisé par digestion *PvuII*. Sur 384 clones analysés, une dizaine ont été sélectionnées pour leur toxicité accrue. Après séquençage, 3 mutants ont été validés. Leur toxicité reste transitoire. Il s'agit des mutants A β_{D23G} , A $\beta_{H13Q, D23E, S26L}$ et A $\beta_{D7T, S8L, L17M}$. La mutation D23G a été intégrée à la phase codante optimisée pour l'expression dans *E.coli* d'A β . La purification de ce mutant a été entreprise. Le protocole appliqué pour la purification des autres mutants n'a cependant pas permis de purifier A β_{D23G} . En effet, le peptide n'est pas solubilisé par l'urée 8 M et ne passe donc pas la membrane de 30 kD (voir Article 2 : Materials and Methods, A β expression and purification). Claude Bobo, qui a mis en place les procédures de purification au laboratoire, a tenté d'adapter le protocole de purification, en faisant varier le pH, ou encore en utilisant du thiocyanate de guanidine, sans succès jusqu'à présent.

Cette purification sera néanmoins mise au point afin de tester la capacité de ce mutant toxique à former *in vitro* des espèces oligomériques possédant une signature de feuillets antiparallèles.

III. Recherche de modulateurs cellulaires de la toxicité d'Aβ.

III.A. Les cribles génétiques

La toxicité d'Aβ dans la levure, tout comme celle des allèles responsables de formes familiales de la MA, n'est pas suffisante pour permettre des cribles génétiques simples. La création d'allèles très toxique d'Aβ a permis d'accéder à ces outils.

Un premier crible génétique a été commencé par Elodie Cougouilles (stage de BTS), puis poursuivi par Geoffray Monteuis (stage de Master 2) et Claude Bobo (Technicienne de notre laboratoire). La banque de délétion EUROSCARF a été transformée en pool par le vecteur d'expression d' $\alpha\text{A}\beta_{\text{G37C}}$ lGFP. Les transformants ont ensuite été directement étalés sur milieu inducteur galactose. Les colonies pouvant croître dans ces conditions ont été repiquées. Afin de s'assurer que la levée de la toxicité n'était pas due à un défaut d'expression et d'induction par le galactose dans ces souches, après une chasse du plasmide, les candidats ont été retransformés par le plasmide d'expression de la GFP. L'expression de la GFP a été validée par visualisation de la fluorescence de la GFP grâce au transilluminateur LED. Les candidats ont été séquencés. 114 délétions restaurent la croissance des levures exprimant $\alpha\text{A}\beta_{\text{G37C}}$ lGFP dans ce crible (Tableau en annexe).

Un second crible a été permis par notre collaboration avec l'équipe de Claudio Di Virgilio, et plus particulièrement Nicolas Talarek. En effet, j'ai pu, au cours de mon séjour dans ce laboratoire, bénéficier de leur robot Singer RoToR HDA et de leur banque de délétion ordonnée. Ces outils permettent de cribler de manière ordonnée et automatisée environ 5000

gènes non essentiels de levure. Ceci est permis, non plus par la transformation individuelle de chaque souche, mais par croisement, sporulation puis sélection des spores d'intérêt (Tong and Boone, 2006; Tong et al., 2007). En Figure 30, sont présentées les principales étapes du crible ordonné.

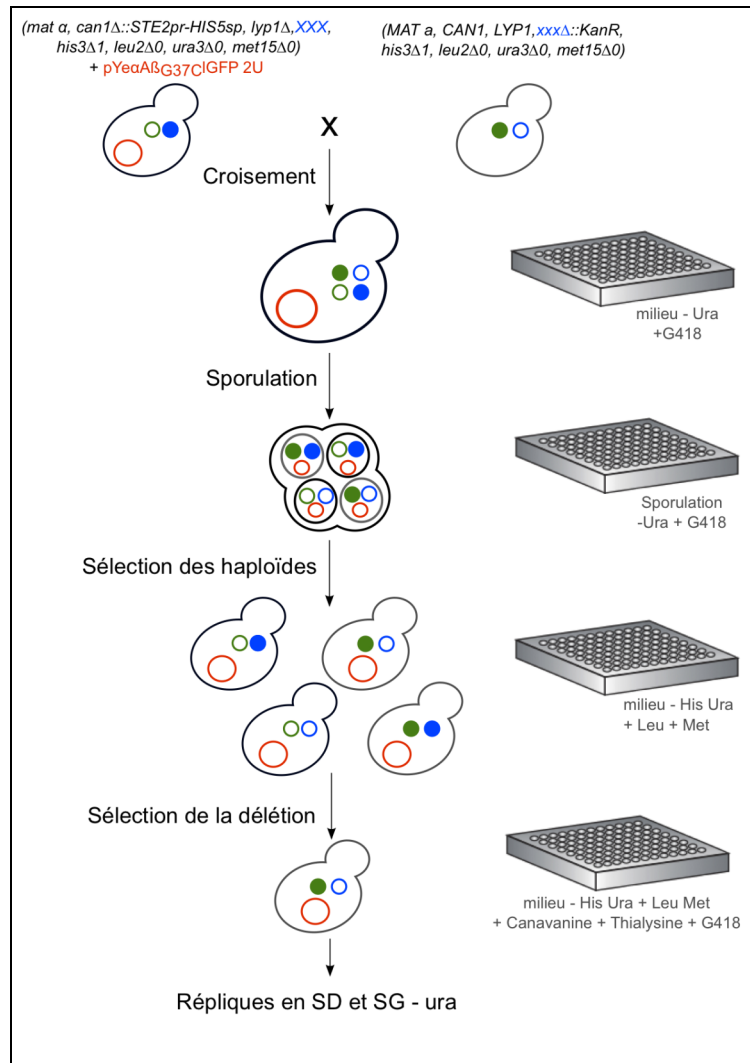


Figure 30 : Principales étapes du crible ordonné.

Après transformation de la souche MAT α par le plasmide d'intérêt, celle-ci est croisée à l'ensemble de la banque de délétion ordonnée de signe sexuel opposé. Après sélection des diploïdes et sporulation, les haploïdes présentant la délétion, les résistances aux antibiotiques et le plasmide sont sélectionnés sur le milieu approprié. Enfin, une réplique sur SD et SG permet, en comparant la croissance des souches, de sélectionner les candidats (d'après (Tong and Boone, 2006)).

Le crible a pu être réalisé sur les souches transformées par les vecteurs d'expression d' α GFP, α Ab_{wt}lGFP et α Ab_{G37C}lGFP, afin de permettre d'identifier des suppresseurs mais aussi des aggravateurs de la toxicité d'A β . J'ai réalisé l'analyse des boîtes par l'utilisation d'ImageJ et ScreenMill, qui permettent la comparaison des croissances relatives dans deux conditions. Aux candidats issus de la comparaison des boîtes SG α GFP et α Ab_{wt}lGFP ou α Ab_{G37C}lGFP sont retirés les candidats issus de la comparaison des boîtes glucose entre elles. 88 candidats sont ainsi obtenus (Tableau en annexe).

L'ensemble des souches a été retransformée par pYeaAb_{arc}lGFP et pYeaAb_{G37C}lGFP par Elodie Cougouille lors de son stage de licence professionnelle. Les tests en gouttes ont permis d'identifier 30 suppresseurs forts et 4 aggravateurs forts de la toxicité. Ils sont présentés Tableau 3.

III.B. Les voies impliquées dans la toxicité d'A β

Seule la souche YML082W Δ est commune aux deux cribles (analyse en vrac et ordonnée). Elle est délétée d'un gène codant pour une protéine putative, qui posséderait une activité carbone-sulfure lyase. Son expression est sous le contrôle des stérols, *via* Upc2p. Ce gène YML082W est adjacent à un gène essentiel, *TUB1*, codant pour l'alpha-tubuline. Il est notoire que la délétion d'un gène par une cassette de résistance, comme dans cette souche, peut influencer l'expression des gènes avoisinants. Ainsi dans le cas d'YML082W, l'effet sur la croissance peut être indirectement lié à une variation d'expression de la tubuline. Il est donc difficile d'émettre une hypothèse impliquant ce gène à partir des données dont nous disposons. La seule approche permettant d'impliquer ce gène ou de l'éliminer serait de transformer la souche mutée par un plasmide portant ce gène sauvage. Si cette transformation

Suppresseurs forts de la toxicité d'Aβ		
YBR111C	YSA1	Nudix hydrolase family member with ADP-ribose pyrophosphatase activity; shown to metabolize O-acetyl-ADP-ribose to AMP and acetylated ribose 5'-phosphate
YDL155W	CLB3	B-type cyclin involved in cell cycle progression; activates Cdc28p to promote the G2/M transition;
YDR448W	ADA2	Transcription coactivator; component of the ADA and SAGA transcriptional adaptor/HAT (histone acetyltransferase) complexes
YDR451C	YHP1	Homeobox transcriptional repressor; binds Mcm1p and early cell cycle box (ECB) elements of cell cycle regulated genes, thereby restricting ECB-mediated transcription to the M/G1 interval; YHP1 has a paralog, YOX1, that arose from the whole genome duplication
YER055C	HIS1	ATP phosphoribosyltransferase; a hexameric enzyme, catalyzes the first step in histidine biosynthesis
YGL072C		Dubious open reading frame; partially overlaps the verified gene HSF1 (Trimeric heat shock transcription factor)
YGR284C	ERV29	Protein localized to COPII-coated vesicles; involved in vesicle formation and incorporation of specific secretory cargo
YIL018W	RPL2B	Ribosomal 60S subunit protein L2B
YIL093C	RSM25	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YIR009W	MSL1	U2B component of U2 snRNP; involved in splicing
YJL129C	TRK1	Component of the Trk1p-Trk2p potassium transport system; 180 kDa high affinity potassium transporter
YJL179W	PFD1	Subunit of heterohexameric prefoldin; prefoldin binds cytosolic chaperonin and transfers target proteins to it
YJR117W	STE24	Highly conserved zinc metalloprotease that functions in two steps of a-factor maturation
YLR149C		Protein of unknown function
YML084W		Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein
YMR103C		Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein
YMR255W	GFD1	Coiled-coiled protein of unknown function; identified as a high-copy suppressor of a dbp5 mutation
YMR273C	ZDS1	Protein with a role in regulating Swe1p-dependent polarized growth; involved in maintaining Cdc55p in the cytoplasm where it promotes mitotic entry; involved in mitotic exit through Cdc14p regulation; interacts with silencing proteins at telomeres; has a role in Bcy1p localization; implicated in mRNA nuclear export
YOL045W	PSK2	PAS-domain containing serine/threonine protein kinase; regulates sugar flux and translation in response to an unknown metabolite by phosphorylating Ugp1p and Gsy2p (sugar flux) and Caf20p, Tif11p and Sro9p (translation)
YOL052C	SPE2	S-adenosylmethionine decarboxylase; required for the biosynthesis of spermidine and spermine
YOR006C	TSR3	Protein required for 20S pre-rRNA processing
YOR296W		Putative protein of unknown function
YOR298C-A	MBF1	Transcriptional coactivator
YPL103C	FMP30	Mitochondrial inner membrane protein with a role in maintaining mitochondrial morphology and normal cardiolipin levels
YPL178W	CBC2	Small subunit of the heterodimeric cap binding complex with Sto1p; interacts with Npl3p, possibly to package mRNA for export from the nucleus
YPL200W	CSM4	Protein required for accurate chromosome segregation during meiosis; involved in meiotic telomere clustering (bouquet formation) and telomere-led rapid prophase movements
YPL239W	YAR1	Ankyrin-repeat containing, nucleocytoplasmic shuttling chaperone; required for 40S ribosomal subunit export, biogenesis and adaptation to osmotic and oxidative stress; expression repressed by heat shock
YPL247C		Putative protein of unknown function
YPR101W	SNT309	Member of the NineTeen Complex (NTC) that contains Prp19p and stabilizes U6 snRNA in catalytic forms of the spliceosome containing U2, U5, and U6 snRNAs
YPR129W	SCD6	Repressor of translation initiation
Aggravateurs forts de la toxicité d'Aβ		
YDR388W	RVS167	Actin-associated protein with roles in endocytosis and exocytosis
YHL005C		Dubious open reading frame; partially overlaps the verified ORF YHL004W (YHL004W, MRP4, Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit)
YKL041W	VPS24	One of four subunits of the endosomal sorting complex required for transport III (ESCRT-III), involved in the sorting of transmembrane proteins into the multivesicular body (MVB) pathway
YDR129C	SAC6	Fimbrin, actin-bundling protein; cooperates with Scp1p (calponin/transgelin) in the organization and maintenance of the actin cytoskeleton

Tableau 3 : Aggravateurs et supresseurs forts de la toxicité d'Aβ.

ne change pas le phénotype, c'est que l'effet physiologique est due à une modification du gène adjacent (*TUB1* dans ce cas).

Après analyse bioinformatique de l'ensemble des supresseurs forts, aucun enrichissement de termes de Gene Ontology n'a pu être établi. En revanche, les quatre aggravateurs forts sont liés à la fonction d'endocytose ($p=0.00089947$) avec une classification dans les complexes protéiques d' « Actine-associated-proteins » ($p=8.22e-05$).

L'étude des souches aux effets les plus forts a attiré notre attention sur la souche *erv29Δ*. *Erv29* est impliquée dans le transport de protéine entre le RE et le Golgi *via* les vésicules COP-II. Sa délétion induit une restauration majeure de la croissance des levures exprimant $\alpha A\beta_{arc}$ IGFP et une absence de forme mature de la construction en western-blot. Contrairement à ce que l'on aurait pu envisager, il semble donc que la rétention de la protéine dans le RE ne soit pas délétère. Il aurait en effet été concevable que la surcharge du RE entraîne l'UPR (Unfolded Protein Response) et un stress du RE, aggravant le défaut de croissance.

L'absence d'effet délétère pour la cellule de l'accumulation d' $A\beta$ dans le RE a été testée grâce à l'ajout de la séquence HDEL. Cette séquence est reconnue par le produit du gène *ERD2* qui permet son retour du Golgi vers le RE afin de l'y séquestrer. Maëlle Duperray, au cours de son stage de Master 1, a construit les plasmides d'expression d' $\alpha A\beta_{wt}$, Arc et $G37C$ IGFP fusionnés à la séquence HDEL en C-ter. Les tests en gouttes montrent une levée partielle de la toxicité de chacune de ces constructions, comparée aux constructions sans séquence de rétention (Figure 31). La restauration de la croissance des levures n'est pas due à un défaut d'adressage, puisque les formes précurseur et glycosylée sont retrouvées en western

blot (non montré). La bande mature, correspondant au clivage de la pro-séquence α par Kex2 au niveau du trans-golgi, est absente, confirmant la rétention dans le RE.

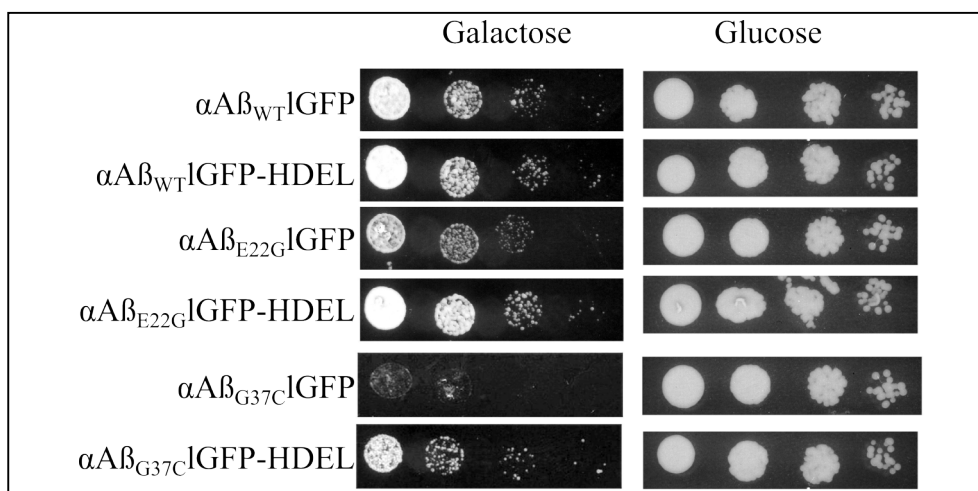


Figure 31 : Toxicité des constructions avec et sans séquence HDEL de rétention au RE.

Les levures transformées par le vecteur d'expression indiqué présentent en test en gouttes une croissance similaire en milieu glucose non inducteur. En milieu inducteur galactose, les levures exprimant les constructions contenant la séquence HDEL présentent une croissance améliorée par rapport à celles exprimant les constructions sans cette séquence.

Il semble donc que la toxicité d'A β dans la levure ne soit pas due à une saturation du RE. Au contraire, la rétention dans le RE des constructions diminue leur toxicité, laissant donc supposer que la toxicité implique la présence d'A β dans un compartiment ultérieur lors de la sécrétion (Golgi, vésicules de sécrétion, espace périplasmique, endosomes et/ou vacuole).

Un autre groupe de gène retrouvé concerne le complexe ESCRT-III (pour *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*). Les complexes ESCRT sont impliqués dans la dégradation des protéines membranaires par le système lysosomal ou par la vacuole dans la levure. ESCRT-III en particulier est responsable de la déformation et de l'abscission membranaire à l'origine des vésicules intraluminales et est importante pour la formation des MVB (*MultiVesicular Bodies*) (Figure 32).

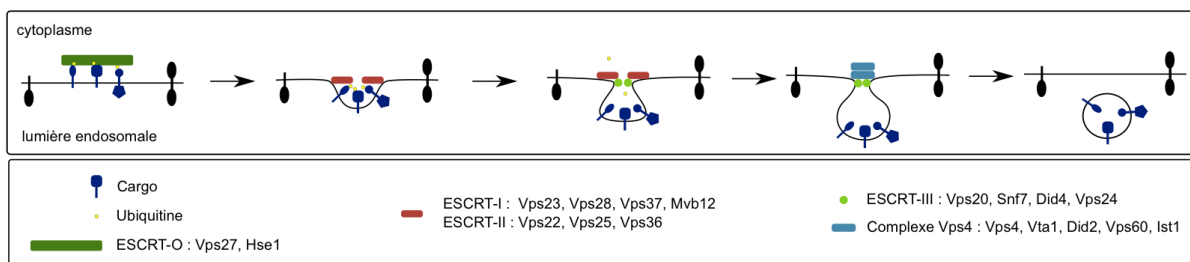


Figure 32 : Mécanisme de formation des vésicules intraluminales par la machinerie ESCRT.

ESCRT-0 permet la reconnaissance de cargo ubiquitinés et le recrutement d'ESCRT-I. ESCRT-II est à son tour recruté par ESCRT-I. ESCRT-III, recruté par ESCRT-II, intervient dans l'étranglement du cou de la vésicule intraluminale et est dissocié par le complexe Vps4.

Le complexe ESCRT-III est composé de 4 sous unités : Vps20, Snf7, Vps24 et Did4 (Figure 33). Dans le crible ordonné, sont retrouvées les souches *vps24Δ* et *snf7Δ*, aggravant le défaut de croissance. Dans le crible en pool, la souche *did2Δ* est retrouvée. Did2 est responsable de la dissociation du complexe ESCRT-III. Sa délétion améliore la croissance des levures exprimant α AbiGFP.

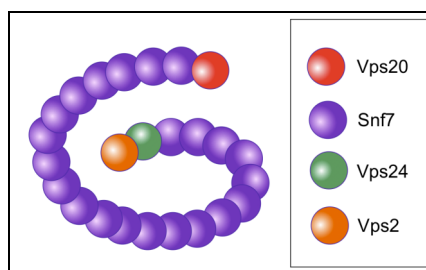


Figure 33 : Organisation schématique du complexe ESCRT-III.

Les sous-unités Snf7 s'assemblent pour former une spirale sur la membrane permettant l'étranglement du cou de la vésicule.

Ces données forment un ensemble cohérent. En effet, une absence de gènes dont l'expression forme le cœur du complexe transitoire ESCRT-III aggrave la toxicité. Une absence d'un gène permettant sa dissociation (et donc aboutissant à sa stabilisation) conduit à l'effet inverse. Dans ces trois souches, l'étude de la maturation des constructions par western-blot montre des variations quantitatives et qualitatives. Des bandes discrètes plus basses que

la bande correspondant à la forme mature AβIGFP sont présentes (Figure 34). La révélation par un anticorps monoclonal dirigé contre Aβ montre que ces bandes correspondent à des formes dégradées qui ne possèdent pas l'épitope détecté par l'anticorps anti-Aβ.

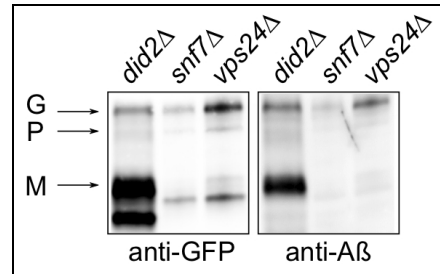


Figure 34 : Maturation d' α Aβ_{arc}IGFP dans les souches *did2Δ*, *snf7Δ* et *vps24Δ*.

Western-blot des souches indiquées exprimant α Aβ_{arc}IGFP. Les flèches indiquent les tailles des formes glycosylée (G), précurseur (P) et mature (M) de la protéine chimérique dans des levures sauvages. Des anticorps anti-GFP (gauche) ou anti-Aβ (droite) ont été utilisés pour la révélation.

Les deux mutants ESCRT-III *snf7Δ* et *vps24Δ* ont un profil similaire, avec une bande correspondant à une forme dégradée de la même taille. Cette taille est compatible avec celle de la GFP seule (environ 27 kD). La souche *did2Δ* quant à elle présente une bande majeure correspondant à la forme mature AβIGFP normale, additionnée d'une autre bande intense plus légère que celles obtenues dans les deux autres souches. L'augmentation de l'intensité de la bande mature dans cette souche *did2Δ* peut indiquer que la maturation d' α AβIGFP est plus efficace, ou bien que la dégradation de cette forme mature est diminuée. La bande plus basse correspond à une forme dégradée en N-ter, dans laquelle la partie Aβ semble absente (car non révélée par l'anticorps anti-Aβ).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis l'élaboration d'un modèle de toxicité d'A β dans la levure. Nous avons pu montrer qu'A β doit être envoyé dans la voie de sécrétion pour induire une toxicité. Comme dans le modèle de toxicité d'A β de Treusch et de ses collaborateurs, les homologues de PICALM, décrit comme facteur de prédisposition à la MA chez l'Homme, influencent la toxicité d'A β , mais de manière opposée. Ces différences peuvent être expliquées par les différences des modèles. En effet, dans le modèle de Treusch et al., A β est adressé à la voie de sécrétion par sa fusion à la séquence signale de Kar2. Cette pré-séquence est clivée dans le RE. Dans notre modèle, la pré-séquence alpha permet l'adressage à la voie de sécrétion et est clivée au niveau du trans-golgi. Ceci peut affecter l'agrégation d'A β , tout comme la présence de la GFP. Les niveaux d'expression d'A β varient également d'un modèle à l'autre, ce qui peut influencer les effets de modulateur. Dans le modèle de Treusch et al., l'expression d'A β est responsable d'une perturbation de l'endocytose et du trafic de récepteur membranaire. La surexpression de *YAP1802* rétablit partiellement ce trafic en rétablissant l'endocytose et ainsi la croissance des cellules. Dans notre modèle, la délétion de l'un ou des deux homologues de PICALM, *YAP1801* et *YAP1802*, réduit la toxicité d'A β et peut être restaurée par la surexpression de l'homologue murin de PICALM. Les délétions d'autres acteurs de l'endocytose dépendante de la clathrine et du trafic vésiculaire lèvent aussi partiellement la toxicité d'A β . Ceci laisse supposer qu'une partie de la toxicité d'A β dans notre modèle s'exercerait dans les compartiments de la voie endocytaire (endosome, MVB, vacuole).

Compte tenu de ces différences, ces deux modèles ne sont donc pas nécessairement en contradiction quant aux effets modulateurs de PICALM. Les différences de quantités d'A β

dans ces deux modèles peuvent par ailleurs être mises en relation avec l'accumulation d'A β au cours du temps dans les cerveaux des patients, et différents mécanismes de toxicité liés aux quantités d'A β peuvent être envisagés.

Notre modèle a également pu mettre en évidence qu'une partie de la toxicité d'A β est liée à des agrégats cytoplasmiques dont la taille peut être modulée par la chaperone cytoplasmique Hsp104. Hsp104 module aussi la toxicité d'A β . Une partie d'A β est donc cytoplasmique, bien qu'adressée à la voie de sécrétion. Ceci nous interroge sur l'origine de la sortie de ces compartiments.

L'expression d'A β affecte la respiration des levures dans des conditions respiratoires. Nous avons vu que cette diminution de la respiration n'est pas due à une diminution du contenu mitochondrial des levures, mais plutôt à une inhibition de la chaîne respiratoire. Afin de consolider ces résultats, il serait intéressant de se pencher sur les effets d'A β sur les différents complexes de la chaîne respiratoire. Ces études seraient facilitées par la possibilité de purifier les mitochondries, et de les exposer aux peptides.

Notre modèle permet également de mimer les effets des différents allèles d'A β . En effet, les mutants Arctic, English, Tottori, Dutch, Iowa et Flemish induisent tous une toxicité. Elle est variable en fonction des allèles, et peut être le reflet de leurs différentes capacités d'assemblage. Ceci permet également de valider la démarche consistant à rechercher des variants « artificiels » très toxiques d'A β pour permettre ensuite de rechercher une signature propre à ces variants. Pourquoi créer ces variants plutôt que de rechercher cette signature dans les allèles d'A β existant ? Nous pouvons envisager que les allèles les plus délétères, à la signature la plus claire, n'existent pas chez l'Homme car sont précocement létaux et donc non transmis à la descendance.

Ce modèle a donc permis de réaliser une étude structure-toxicité du peptide A β . 39 variants très toxiques d'A β ont été sélectionnés sans *a priori* après une mutagenèse aléatoire. L'analyse des mutations montre que la plupart des résidus sont touchés, avec en moyenne 2,5 mutations par variants. Le classement des mutations en fonction de la toxicité montre que les variants les plus toxiques présentent majoritairement des mutations dans la partie C-ter du peptide, plus particulièrement des résidus 18 à 42 impliqués dans le repliement en feuillets β . Quatre résidus ne sont pas mutés dans ce crible, dont deux ont pu être décrits comme essentiel à la toxicité du peptide dans la levure : l'isoleucine 31 et la leucine 34. D'autres résidus présentent exclusivement des mutations silencieuses, et pourraient aussi constituer des résidus essentiels pour la toxicité. Il s'agit de l'isoleucine 32 et la Valine 36. Il serait intéressant d'en tester les mutations faux-sens afin d'établir l'absence de mutation est due au aléas de la mutagenèse ou si, comme les résidus I31 et L34, ils sont indispensables à la toxicité d'A β *in vivo*.

L'étude des propriétés d'assemblage des monomères purifiés de différents variants toxiques et non toxiques n'a pas permis de mettre en évidence une signature de la toxicité. En effet, les peptides forment tous des fibres riches en feuillets β parallèles. Si des intermédiaires d'assemblage en cours de fibrillation sont spécifiques des variants toxiques ou non toxiques, nous n'avons pas pu les mettre en évidence. Ils semblent que, s'ils existent, ces intermédiaires soient en trop faible quantité pour pouvoir les isoler.

Néanmoins, nous avons pu montrer que seuls les peptides toxiques sont capables de former au cours de la purification, plus particulièrement au cours de la diminution progressive de la concentration d'urée, des espèces oligomériques stables. Ces oligomères sont capables de s'assembler en fibres riches en feuillets β anti-parallèles, qui ne peuvent servir de noyaux d'assemblage aux variants non toxiques d'A β . Ces oligomères présentent également une toxicité sur des cellules en culture. La signature anti-parallèle de fibres amyloïdes toxiques a

déjà été décrite. Une étude structure-toxicité de HET-s réalisée dans le laboratoire Analyse Fonctionnelle des Amyloïdes a permis de corrélérer la toxicité de variants toxiques de HET-s à leur richesse en feuillets β anti-parallèles. Ces variants toxiques perturbent fortement les modèles membranaires (Berthelot et al., 2011). Les peptides A β présentent une forte affinité pour les lipides, et la formation de pores membranaires par A β est une hypothèse avancée pour expliquer la toxicité du peptide. Il serait intéressant de rechercher les effets des différentes espèces toxiques et non toxiques d'A β sur des systèmes membranaires, pouvant expliquer la toxicité des peptides *in vivo*.

Des oligomères antiparallèles formés par le fragment 17-42 d'A β contenu dans la boucle de la chaîne légère d'une immunoglobuline de requin ont été cristallisés. V. Streltsov et ses collaborateurs ont ainsi décrit un tétramère stabilisé par un cœur hydrophobe dans lequel le résidu L34 est capital (Streltsov et al., 2011) (Figure 35). Par ailleurs, dans ce modèle, le résidu I31 est important pour la stabilité du dimère.

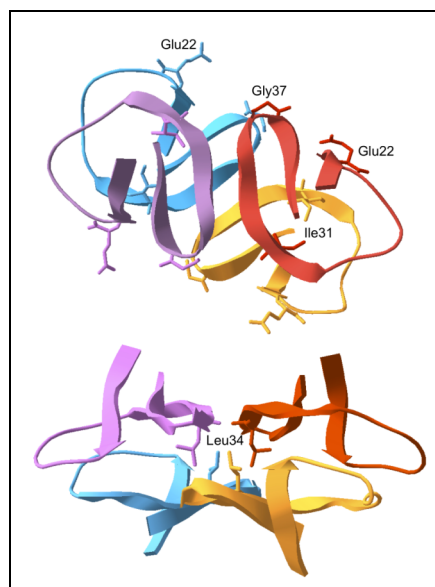


Figure 35 : Modèle des tétramères du fragment A β ₁₈₋₄₁ de Streltsov et ses collaborateurs.

Sont indiqués les résidus L34, I31 qui forment des poches hydrophobes stabilisant les tétramères et dimères, et les résidus E22 et G37.

Il est intéressant de noter que ces mêmes résidus sont importants pour la toxicité des peptides dans la levure. Cette analogie ouvre une piste quant aux objets que pourraient former les oligomères toxiques que nous avons mis en évidence. V. Streltsov et ses collaborateurs ont également construit un modèle d'assemblage des tétramères en fibres, reposant sur des interactions hydrophobes. Il serait intéressant d'établir si les fibres larges formées par les oligomères toxiques et antiparallèles que nous avons décrites sont agencées en cross-bêta, ou si elles sont formées par d'autres interactions. Ces analyses pourraient être menées par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS/WAXS).

Enfin, la principale limite de cette étude structure-toxicité du peptide réside dans le fait que la toxicité soit mesurée par l'expression du peptide fusionné à la GFP, approximativement 6 fois plus grosse que le peptide A β . On ne peut négliger l'effet que peut avoir la GFP sur le repliement du fragment A β *in vivo*. C'est pourquoi une recherche de variants très toxique d'A β seul a été entreprise. Un variant D23G toxique sans GFP dans la levure a ainsi été sélectionné par mutagenèse aléatoire. Les tentatives de purification montrent que le peptide D23G forme des agrégats dans la bactérie, et que ces agrégats ne sont pas dissous dans les conditions utilisées pour les autres variants. De nouvelles approches sont envisagées pour faciliter la purification de ces peptides, comme la traduction *in vitro* (*Rapid Translation System*), et pour pouvoir analyser les objets qu'ils forment.

La recherche des espèces toxiques *in vivo* pourrait aussi être entreprise. Les essais de caractérisation d'espèces formées dans la levure par des techniques d'électrophorèse dans des conditions natives n'ont pas abouti pour des raisons techniques. Jusqu'à présent, *in vivo*, la présence d'espèces différentes selon les variants d'A β exprimés n'a pas été démontrée. La recherche de noyau d'assemblage dans des extraits de levure pourrait être envisagée. Pour cela il faudrait pouvoir mélanger un extrait semi-purifié au peptide soluble et mesurer

l'assemblage de ce dernier (l'utilisation d'extraits bruts n'ayant pas permis cette approche car générant un bruit de fond trop important).

Nous avons donc dans ce travail mis en évidence des facteurs en *cis* important pour la toxicité d'A β , nous nous sommes également penchés sur les facteurs en *trans* modulant sa toxicité *in vivo*.

La création du mutant très toxiques G37C a permis la réalisation de deux cribles génétiques, le premier par transformation directe d'un pool des souches de la banque de délétion Euroscarf, le second par croisement et sporulation. Parmi les 201 souches, issues des deux cribles, qui modulent la toxicité d'A β *in vivo*, une seule souche est commune aux deux cribles : la souche YML082W, délétée d'un gène codant pour une protéine putative, qui possèderait une activité carbone-sulfure lyase. Il est cependant important de noter que ce gène est juxtaposé à un gène essentiel, *TUB1*, codant pour l'alpha tubuline (Figure 36). Il a déjà été montré que la délétion d'un gène par une cassette telle que celle utilisée dans les souches Euroscarf peut influencer l'expression des gènes adjacents. On retrouve ainsi dans ces cribles des souches délétées de gènes adjacents à des gènes essentiels dont des variations de l'expression pourraient être à l'origine de la modulation de la toxicité. On retrouve plusieurs exemples dans ces cribles, ainsi que des délétions de gènes qui chevauchent d'autres gènes pouvant eux-mêmes intervenir dans la toxicité d'A β . Ceci est admirablement illustré par la souche YGL072C, qui est délétée d'une ORF douteuse, chevauchant le gène essentiel HSF1 codant pour un facteur de transcription activé en réponse à divers stress (Figure 36). Un autre exemple est celui des souches YIR004W délétée d'un gène proche de YIR006C codant pour une protéine essentielle, Pan1, qui est impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine cortical. Afin d'éliminer ces biais, la complémentation par la réintroduction de l'ORF délétée devrait être systématiquement vérifiée.

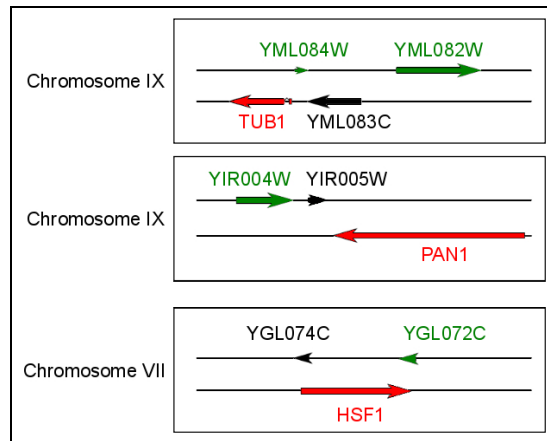


Figure 36 : Position chromosomique des loci indiqués.

Les gènes délétés (en vert) retrouvés dans les cribles sont parfois adjacents à d'autres gènes essentiels (en rouge), pouvant modifier leur expression.

Il est remarquable qu'exceptée la souche YML082W, aucune ne soit commune aux deux cribles. Ceci peut être expliqué par les méthodes employées. En premier lieu, les souches sensibles à la transformation ne peuvent pas être retrouvées dans le crible en pool, et inversement, les souches présentant des difficultés de croisement ou de sporulation peuvent échapper au crible ordonné. D'autre part, dans le crible en pool, les transformants sont immédiatement placés sur milieu inducteur tandis que dans le crible ordonné, les cellules sont répliquées à plusieurs reprises avant l'induction de l'expression des constructions. Une fuite du promoteur galactose peut donc être à l'origine d'un biais non négligeable dans ce crible. Enfin dans le crible en pool, la sélection porte sur la capacité d'une seule cellule à former une colonie, tandis que le crible ordonné concerne un mélange de cellules et une variation de taille de la colonie formée par ce mélange. Tout ceci peut expliquer ce manque apparent de recoupement des deux cribles.

Nous avons cependant vu que des souches délétées de gènes dont les produits interviennent dans la même voie peuvent être retrouvées.

C'est le cas des souches *vps24Δ*, *snf7Δ* et *did2Δ*. On retrouve donc deux membres du complexe ESCRT-III composé de 4 sous-unités, et un régulateur de ce complexe. Par ailleurs, chez l'Homme, des mutations d'ESCRT-III sont impliquées dans certains cas de démences fronto-latérales (Lee et al., 2007). Afin de s'assurer que le complexe est bien impliqué dans la toxicité d'Aβ, les souches délétées des autres sous-unités devraient être testées.

Ce complexe intervient dans la machinerie ESCRT qui permet le tri et la dégradation de protéine membranaire. Dans la membrane endosomale, le cargo ubiquitiné est reconnu. Dans une seconde étape, la machinerie ESCRT déforme la membrane endosomale, permettant le piégeage du cargo dans une invagination, et enfin, permet l'abscission de l'invagination et la formation de vésicules intraluminales. La machinerie ESCRT comporte 4 complexes, ESCRT -0 à -III (Figure 37). La dissociation du complexe ESCRT-III est assurée par Vps4, dont l'activité est régulée notamment par Did2.

Les mutants déstabilisant le complexe ESCRT-III aggravent la toxicité d'Aβ, le mutant stabilisant le complexe sauve de la toxicité. La présence du complexe et sa stabilisation préserve donc de la toxicité. Il serait intéressant de tester les relations d'épistasie entre les sous-unités du complexe ESCRT-III et les acteurs de sa dissociation afin de déterminer s'il agissent bien dans la même voie pour moduler la toxicité d'Aβ. Si c'est le cas, les mutants des autres protéines impliqués dans la dissociation du complexe ESCRT-III (Vps4, Ist1, Vps60...) devraient présenter un phénotype comparable à celui de *did2Δ* : une restauration de la croissance des levures.

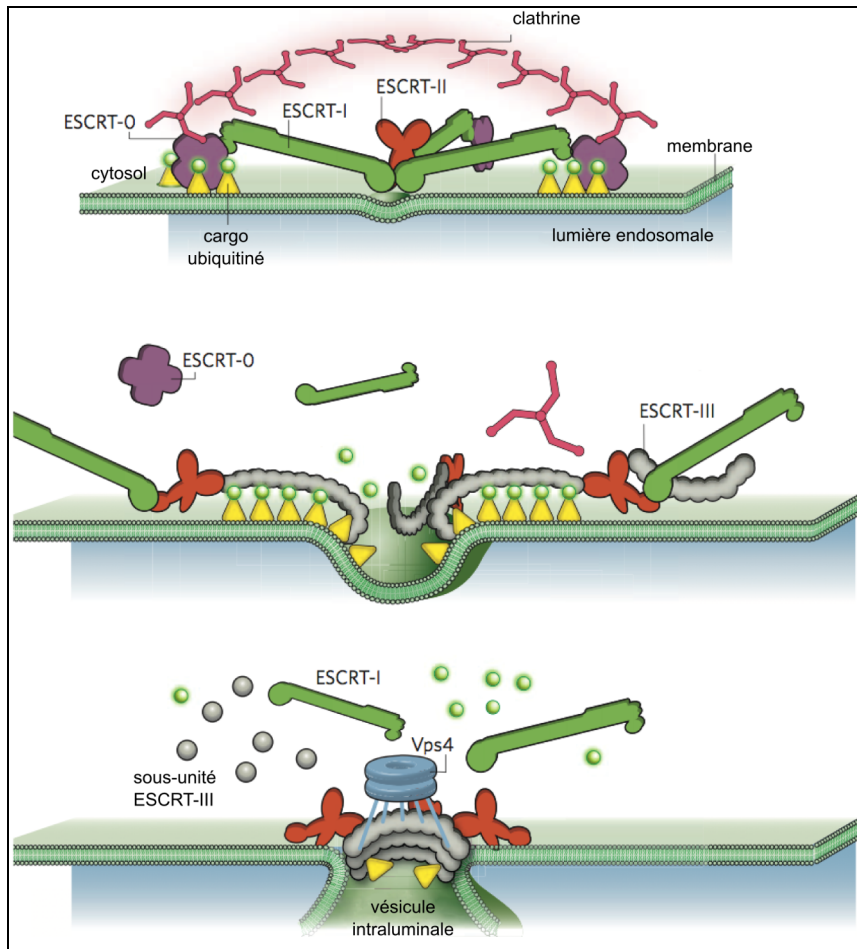


Figure 37 : La machinerie ESCRT dans le tri endosomal de protéines membranaires ubiquitinylées.

Le cargo est reconnu par ESCRT-0, qui recrute ESCRT-I qui recrute lui-même ESCRT-II débutant l'invagination membranaire. ESCRT-II recrute ensuite ESCRT-III, qui s'arrange en spirale sur la membrane permettant l'étranglement de la vésicule en formation. Le complexe Vps4 intervient dans la dissociation d'ESCRT-III et permet ainsi l'abscission de la membrane (Raiborg and Stenmark, 2009).

La toxicité d'A β peut être liée à cette fonction de tri des protéines membranaires. Si cette fonction est impliquée, les mutants des autres complexes ESCRT-0 à II devraient présenter le même phénotype que les mutants ESCRT-III. Le fait de n'avoir retrouvé aucun gène de structure des protéines formant ces autres complexes ne milite pas en faveur de cette hypothèse qui devrait néanmoins être spécifiquement testée.

Il peut aussi s'agir d'un effet indirect de la machinerie ESCRT, dont l'absence est souvent associée à un défaut d'endocytose tardive conduisant à un blocage des protéines à la membrane, mais également à l'accumulation de protéines vacuolaires dans un compartiment pré-vacuolaire appelé « compartiment de classe E » (Raymond et al., 1992). On peut ainsi supposer qu'AβGFP s'accumule à la membrane, exacerbant sa toxicité. Cette hypothèse serait cohérente avec les phénotypes observés chez les mutants du remodelage de l'actine et de l'endocytose qui possèdent les mêmes phénotypes que les mutants ESCRT-III. Ceci pourrait être testée par la construction de double mutant de l'endocytose et de la dissociation d'ESCRT-III. Si l'effet de la délétion des ESCRT-III sur la toxicité d'Aβ est lié à l'endocytose, le phénotype d'une délétion stabilisant le complexe ESCRT-III (tel *did2Δ*) sera masqué par le phénotype des délétions des acteurs de l'endocytose. On aura donc une croissance altérée. Encore une fois, le fait de n'avoir retrouvé que des sous-unités d'ESCRT-III milite plutôt en faveur d'une action propre de ce complexe.

On peut également émettre l'hypothèse que l'altération de la voie de dégradation des protéines membranaires par la vacuole dans ces mutants peut aussi avoir des effets sur les autres voies de dégradation (protéasome et autophagie notamment), pouvant éventuellement conduire à une saturation de ces voies et à la toxicité observée dans ces souches. L'intégrité de ces voies de dégradation devra être testée dans ce contexte par l'utilisation des systèmes rapporteurs de l'activité du protéasome et de l'autophagie dont nous disposons.

Dans les souches *snf7Δ*, *did2Δ* et *vps24Δ*, une forme AβGFP sans l'épitope d'Aβ reconnu par l'anticorps est retrouvée en western-blot. Le lien entre blocage de l'internalisation de protéine membranaire dans des MVB et dégradation d'une partie d'Aβ est flou. Ceci pourrait être dû à une dégradation de la forme mature AβGFP dans la vacuole, où la GFP, elle, n'est pas dégradée. Cette hypothèse peut être aisément testée par microscopie ou purification des vacuoles.

Il a été montré que la localisation de certaines hydrolases vacuolaires est altérée dans des mutants ESCRT-III, avec la présence d'un compartiment prévacuolaire spécifique au mutant de classe E dans lequel des enzymes vacuolaires s'accumulent (Odorizzi et al., 1998; Raymond et al., 1992). Ceci pourrait expliquer les différents profils obtenus en western-blot dans les mutants *vsp24Δ*, *snf7Δ* et *did2Δ*. Des analyses supplémentaires devront être réalisées pour éclaircir la dégradation d'Aβ dans ce contexte. L'étude des profils de dégradation d'Aβ-GFP dans d'autres mutants de classe E ne touchant pas ESCRT-III peut être envisagée. L'état de la vacuole et son équipement en hydrolases pourraient également être étudiés dans ces mutants.

Dans les cellules de mammifères, chez les drosophiles, les nématodes, les complexes ESCRT sont en connexion avec l'autophagie. Dans la levure, cette connexion n'a été établie que pour le complexe ESCRT-0. Ayant retrouvé dans les cribles trois gènes de structure (ATG1, ATG2 et ATG20) de protéines impliquées dans l'autophagie et la voie de dégradation cytoplasme-vacuole, nous pourrions envisager de nous pencher sur les relations entre ESCRT et autophagie dans la toxicité d'Aβ. Les mutants d'autophagie *atg1Δ*, *atg2Δ* et *atg20Δ* restaurent tous la croissance de la levure, ce qui semble *a priori* surprenant. En effet, on pourrait penser que la dégradation par cette voie des agrégats cytoplasmiques d'Aβ diminuerait sa toxicité. Il semble donc que les mécanismes impliqués soient plus complexes que cela. La génétique nous permettra d'établir si les effets d'ESCRT et de l'autophagie sur la toxicité d'Aβ sont en lien par l'utilisation de double mutant. Nous avons par ailleurs déjà envisagé plus haut de mesurer l'efficacité de l'autophagie dans les mutants ESCRT-III. Ces mesures apporteront également des éléments de réponse.

Nous n'avons pas retrouvé dans ce crible les Yap1801 et Yap1802 homologues de PICALM. Les variations de toxicité d'Aβ dans les souches délétées sont inférieures aux

variations de toxicité obtenues au cours du crible. Ceci explique leur absence. On retrouve cependant dans ces cribles plusieurs gènes dont les produits sont impliqués dans le remodelage du cytosquelette d'actine corticale, particulièrement lors de l'endocytose. Il s'agit de *Sac6Δ*, *SlalΔ*, *Abp1Δ*, *Rvs167Δ* et *End3Δ*. Excepté *abp1Δ*, toutes ces délétions aggravent le défaut de croissance. La diminution de l'endocytose aggrave la toxicité d'Aβ. On peut envisager qu'Aβ exerce une partie de sa toxicité à la membrane plasmique, en formant des pores par exemple. L'endocytose serait donc un moyen de débarrasser de la membrane ces altérations. La diminution de l'endocytose serait alors dramatique pour la cellule. La perméabilité de la membrane plasmique semble cependant difficile à tester dans la levure, du fait de la paroi. L'utilisation de membrane artificielle *in vitro* pourrait apporter des éléments sur la perméabilisation des membranes par Aβ. *In vivo*, l'entrée dans les cellules de sondes fluorescentes pourrait être mise à l'essai pour mesurer la perméabilisation. Les techniques mesurant les potentiels de membranes (Patch Clamp (Stefan et al., 2013)) semblent difficiles à mettre en place dans notre système, mais fournirait des réponses claires quant aux flux d'ions de part et d'autre de la membrane plasmique, décelant ainsi les variations causées par Aβ.

Le lien entre cytosquelette et toxicité d'Aβ peut également être indirect, modifiant par exemple la vitesse du trafic vésiculaire, et permettant la rétention d'Aβ dans des compartiments où il exercerait sa toxicité.

La toxicité de protéines sécrétées est très souvent associée à leur accumulation dans le RE. De manière très surprenante, nous avons pu montrer que la rétention et l'accumulation dans le RE d'Aβ n'induit pas de stress du RE, et lève partiellement la toxicité d'Aβ. La toxicité d'Aβ s'exerce donc en aval de son passage dans le RE.

Ces cribles ouvrent donc plusieurs pistes pour des travaux ultérieurs. Il apparaît évident que la toxicité d'A β est complexe, même dans ce système simplifié qu'est la levure.

Les pistes obtenues grâce à ce modèle pourront être explorées dans des systèmes de cellules de mammifères dont le laboratoire dispose.

Matériels et Méthodes

I. Souches, milieux et plasmides

Les souches utilisées dérivent toutes de la souche BY4742 (*MATa*, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *ura3Δ0*). Les souches du crible ordonné possèdent le génotype suivant : (*MATa*, *CAN1*, *LYP1*, *xxxΔ::KanR*, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *ura3Δ0*, *met15Δ0*) et sont croisées avec la souche (*MATα*, *can1Δ::STE2pr-HIS5sp*, *lyp1Δ*, *XXX*, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *ura3Δ0*, *met15Δ0*).

Les milieux utilisés sont décrits dans les articles. Les milieux utilisés pour le crible ordonné sont récapitulés Tableau 4.

Milieux	Composition
Sélection diploïdes SD-U+G418	Glucose (20 g/L), DO-Ura (2 g/L), acide glutamique (1 g/L), YNB wo ammonium (1,7g/L), G418 (200 mg/L), agar (20 g/L)
Sporulation	Glucose (0,5 g/L), DO-Ura (0,5 g/L), Uracile (17 mg/L), acétate de potassium (10 g/L), G418 (50 mg/L), agar (20 g/L)
Sélection S1, SD-HU+ML+Can+Thia	Glucose (20 g/L), DO-His-Ura-Met-Leu (2 g/L), Met (70 mg/L), Leu (370 mg/L), canavanine (50 mg/L), thialysine (50 mg/L), agar (20 g/L)
Sélection S2, SD-HU+Can+Thia+G418	Glucose (20 g/L), DO-Lys-Leu-Arg-His-Ura (1,3 g/L), Leu (370 mg/L), YNB (1,7 g/L), canavanine (50 mg/L), thialysine (50 mg/L), G418 (200 mg/L), agar (20 g/L)
Milieu non inducteur, SD-U+Can+Thia+G418	Glucose (20 g/L), YNB (1,7g/L) DO-Trp-His-Leu-Ura-Ade (2g/L), Acide glutamique (1g/L), Leu (370 mg/L), Ade (70 mg/L), Trp (70 mg/L), canavanine (50 mg/L), thialysine (50 mg/L), G418 (200 mg/L), agar (20 g/L)
Milieu inducteur, SG-U+Can+Thia+G418,	Galactose (20 g/L), YNB (1,7g/L) DO-Trp-His-Leu-Ura-Ade (2g/L), Acide glutamique (1g/L), Leu (370 mg/L), Ade (70 mg/L), Trp (70 mg/L), canavanine (50 mg/L), thialysine (50 mg/L), G418 (200 mg/L), agar (20 g/L)

Tableau 4 : Milieux utilisés lors du crible ordonné.

Les plasmides utilisés sont décrits dans les articles.

II. Mutagenèse dirigée

Les mutagenèses dirigées ont été réalisées à l'aide du kit Stratagene « QuikChange™ Site-Directed mutagenesis Kit ». Les mutations familiales ont été intégrées grâce aux couples d'amorces suivant : Dutch : 1018 et 1019, Iowa : 1024 et 1025, English : 1020 et 1021, Tottori : 1026 et 1027, Flemish : 1022 et 1023 (Tableau 5), sur le plasmide pYeo α A β_{wt} IGFP 2U.

N°	Séquence
1018	5'-CCTTTGTTTGAACCCACATCttgTGCAAAGAACACCAATTTTTG-3'
1019	5'-CAAAAATTGGTGTTCTTTGCaaaGATGTGGGTTCAAACAAAGG-3'
1020	5'-CATATCCTGAGTCacgTCGGAATTCTGCATCC-3'
1021	5'-GGATGCAGAATTCCGAcgtGACTCAGGATATG-3'
1022	5'-CTTTGTTTGAACCCACATCTTCaccAAAGAACACCAATTTTTGATG-3'
1023	5'-CATCAAAAATTGGTGTTCTTTggtGAAGATGTGGGTTCAAAC-3'
1024	5'-GCACCTTTGTTTGAACCCACggtTTCTGCAAAGAACACC-3'
1025	5'-GGTGTTCTTTGCAGAAaacGTGGGTTCAAACAAAGGTGC-3'
1026	5'-GATGAACTTCATATCCTGAgttATGTCGGAATTCTGCATC-3'
1027	5'-GATGCAGAATTCCGACATaacTCAGGATATGAAGTTCATC-3'
1080	5'-Catatgatggacgctgaatt-3'
1081	5'-CCTGCCGAGCTCCTATAagcgatcacaacgccacc-3'
902	5'-tattgccagcattgctgc-3'
546	5'-ACATAGAAATATCGAATGGG-3'

Tableau 5 : Amorces utilisées.

Une cassette *NdeI-NdeI* contenant la phase codante pour A β_{D23G} optimisée pour l'expression dans *E.coli* a été synthétisée par Genscript. Le fragment a été amplifié par PCR à l'aide des amorces 1080 et 1081 (Tableau 5) afin d'y ajouter les sites *NotI* et *SacI* permettant son intégration aux sites *NotI-SacI* du plasmide A β (M1-42).

Tous les plasmides ont été vérifiés par séquençage.

III. Mutagenèse aléatoire

La mutagenèse aléatoire a été réalisée par PCR mutagénisante (cf. Résultats, partie II.B). Le fragment amplifié par PCR avec les amorces 546 et 902 sur le plasmide pYeaA β 2U a été intégré au plasmide pYeaA β_{arc} 2U linéarisé par digestion *Bsu36I* par Gap repair. Les levures transformées ont été repiquées sur milieu SD et SG casa. Les souches présentant un défaut de croissance en SG casa ont été sélectionnées, les plasmides sont ressortis par extraction phénol-chloroforme, et amplifiés dans *E.coli*. La toxicité est à nouveau testée en SD et SG casa et les candidats validés sont séquencés.

IV. Crible génétique ordonné

La souche (*MAT α* , *can1 Δ ::STE2pr-HIS5sp*, *lyp1 Δ* , *XXX*, *his3 Δ 1*, *leu2 Δ 0*, *ura3 Δ 0*, *met15 Δ 0*) transformée par les plasmides pYeaGFP 2U, pYeaA β_{wt} IGFP 2U ou pYeaA β_{G37C} IGFP 2U sont croisées sur milieu complet YPD avec les souches délétées de génotype (*MAT α* , *CAN1*, *LYP1*, *xxx Δ ::KanR*, *his3 Δ 1*, *leu2 Δ 0*, *ura3 Δ 0*, *met15 Δ 0*) organisés en 4 réplicats à raison de 384 souches différentes par boîtes. L'ensemble de la banque de délétion est donc compris dans 20 boîtes. Les croisements sont réalisés en mélangeant les cellules MAT α transformées aux cellules des souches délétées de signe sexuel opposé par prélèvement automatisé des cellules. Après 24 heures de croissance à 30 °C, les prélèvements de chaque « patch » de cellules sont déposés sur le milieu de sélection des diploïdes SD-Ura+G418. Après deux jours de croissance à 30 °C, les diploïdes sont prélevés et déposés sur le milieu de sporulation. Après 15 jours de sporulation à 30 °C, les haploïdes sont sélectionnés sur milieu de sélection S1, puis les levures résistantes au G418 sont sélectionnées sur le milieu de sélection S2. Les souches ainsi obtenues sont déposées sur milieu non inducteur et inducteur, et analysées après 48 heures de croissance à 30 °C.

La quantification de la taille des colonies a été réalisée par l'utilisation de l'outil de mesure des colonies (ScreenMill-colony measurement engine) sur ImageJ. Ces résultats ont ensuite été visualisés grâce au ScreenMill-Data Review et ScreenMill-Screen Visualization (Baryshnikova et al., 2010; Dittmar et al., 2010; Tong and Boone, 2006). Les mesures obtenues pour les colonies en milieu inducteur d' α GFP ont été comparées à celles obtenues pour α A β_{wt} lGFP ou α A β_{G37C} lGFP. À l'ensemble des candidats obtenus ont été retirées les souches positives lors de la comparaison des colonies en milieu non inducteur.

V. Immuno-précipitation

L'immuno-précipitation de la GFP ont été réalisées sur des levures transformées par pYea α A β_{wt} lGFP 2U, pYea α GFP 2U ou pYea α A β_{arc} lGFP 2U. À partir d'une préculture en SD Casa d'une dizaine de clones de levures transformées, les cellules ont été diluées en SG casa à 1 UDO/mL. Après 6 ou 24 h d'expression à 30 °C, 10 UDO de cellules ont été récoltées. L'immuno-précipitation a été réalisée à l'aide du kit « μ MACSTM Epitope Tag Protein Isolation Kit » de Miltenyi Biotec selon les recommandations du fournisseur. Les protéines ont été analysées en SDS-PAGE puis les gels ont été colorés à l'argent.

VI. Mesure de la respiration mitochondriale

Les mesures de consommation d'oxygène ont été réalisées sur les cellules en culture. Une préculture en milieu Lactate de levures transformées par le plasmide vide pYeHFN 2U ou le plasmide pYea α A β_{arc} lGFP est diluée à 0,3 UDO/mL dans du milieu lactate additionné de Galactose 0,2 %. À 0 et 8 h d'induction, 1mL de cellules en culture est prélevé. Les mesures de consommation d'oxygène sont réalisées par polarographie en utilisant une électrode de Clark dans une chambre thermostatée à 30 °C. Les taux respiratoires (JO₂) ont été déterminés à partir de la pente de la droite de la consommation d'O₂ en fonction du temps. Les mesures

ont été également réalisées après l'ajout d'éthanol (0,1 % final), de Triéthyltin (TET) (0,2 mM final) ou de carbonyl cyanide p-chlorophenylhydrazone (CCCP) (40µM final).

ANNEXES

I. Tableau récapitulatif des cribles génétiques

Ce tableau récapitule l'ensemble des deux cribles génétiques, ordonné (O) et positif (P). Pour chaque souche, sont indiqués les noms systématique et commun et la description du produit du gène délété, le crible dont elle est issu et enfin son phénotype de croissance lors de l'expression d' $\alpha A\beta_{E22G}$ lGFP (- : croissance altérée, + : croissance améliorée).

Nom systématique	Nom commun	Description	Crible	Croissance
YAL021C	CCR4	Component of the CCR4-NOT transcriptional complex; CCR4-NOT is involved in regulation of gene expression; component of the major cytoplasmic deadenylase, which is involved in mRNA poly(A) tail shortening	O	-
YAL064C-A	TDA8	Putative protein of unknown function; null mutant is sensitive to expression of the top1-T722A allele; not an essential gene	P	+
YAR031W	PRM9	Pheromone-regulated protein; contains 3 predicted transmembrane segments and an FF sequence, a motif involved in COPII binding; member of DUP240 gene family; PRM9 has a paralog, PRM8, that arose from a segmental duplication	O	+
YBL007C	SLA1	Cytoskeletal protein binding protein required for assembly of the cortical actin cytoskeleton; interacts with proteins regulating actin dynamics and proteins required for endocytosis; found in the nucleus and cell cortex; has 3 SH3 domains	O	-
YBL042C	FUI1	High affinity uridine permease, localizes to the plasma membrane; also mediates low but significant transport of the cytotoxic nucleoside analog 5-fluorouridine; not involved in uracil transport; relative distribution to the vacuole increases upon DNA replication stress	O	+
YBL072C	RPS8A	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit; homologous to mammalian ribosomal protein S8, no bacterial homolog; RPS8A has a paralog, RPS8B, that arose from the whole genome duplication	O	+
YBR083W	TEC1	Transcription factor targeting filamentation genes and Ty1 expression; Ste12p activation of most filamentation gene promoters depends on Tec1p and Tec1p transcriptional activity is dependent on its association with Ste12p; binds to TCS elements upstream of filamentation genes, which are regulated by Tec1p/Ste12p/Dig1p complex; competes with Dig2p for binding to Ste12p/Dig1p; positive regulator of chronological life span; TEA/ATTS DNA-binding domain family member	P	+
YBR111C	YSA1	Nudix hydrolase family member with ADP-ribose pyrophosphatase activity; shown to metabolize O-acetyl-ADP-ribose to AMP and acetylated ribose 5'-phosphate	O	+++
YBR113W		Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data; partially overlaps the verified gene CYC8	O	-
YBR173C	UMP1	Short-lived chaperone required for correct maturation of the 20S proteasome; may inhibit premature dimerization of proteasome half-mers; degraded by proteasome upon completion of its assembly	O	-
YBR209W		Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data; YBR209W is not an essential gene	O	+
YBR212W	NGR1	RNA binding protein that negatively regulates growth rate; interacts with the 3' UTR of the mitochondrial porin (POR1) mRNA and enhances its degradation; overexpression impairs mitochondrial function; interacts with Dhh1p to mediate POR1 mRNA decay; expressed in stationary	O	+
YBR266C	SLM6	Protein with a potential role in actin cytoskeleton organization; gene exhibits synthetic genetic interaction with MSS4 encoding phosphatidylinositol 4-phosphate kinase	O	++
YBR267W	REI1	Cytoplasmic pre-60S factor; required for the correct recycling of shuttling factors Alb1, Arx1 and Tif6 at the end of the ribosomal large subunit biogenesis; involved in bud growth in the mitotic signaling network	O	++
YBR284W		Putative metallo-dependent hydrolase superfamily protein; similar to AMP deaminases but lacks key catalytic residues and does not rescue purine nucleotide metabolic defect of quadruple aah1 ade8 amd1 his1 mutant; null mutant exhibits longer telomeres, altered Ty mobility, decreased resistance to rapamycin and wortmannin; induced in response to hydrostatic pressure; not an essential gene; YBR284W has a paralog, YJL070C, that arose from the whole genome duplication	P	+
YCL058C	FYV5	Protein involved in regulation of the mating pathway; binds with Matalpha2p to promoters of haploid-specific genes; required for survival upon exposure to K1 killer toxin; involved in ion homeostasis	O	+
YCR085W		Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data	P	+
YCR088W	ABP1	Actin-binding protein of the cortical actin cytoskeleton; important for activation of the Arp2/3 complex that plays a key role actin in cytoskeleton organization; phosphorylation within its PRR (Proline-Rich Region), mediated by Cdc28p and Pho85p, protects Abp1p from proteolysis mediated by its own PEST sequences	O	+
YCR099C		Putative protein of unknown function	P	+
YCR102C		Putative protein of unknown function; involved in copper metabolism; similar to C. carbonum toxD gene; member of the quinone oxidoreductase family	P	+
YDL013W	SLX5	Subunit of the Slx5-Slx8 SUMO-targeted ubiquitin ligase (STUbL) complex, stimulated by SUMO-modified substrates; contains a RING domain and two SIMs (SUMO-interacting motifs); forms SUMO-dependent nuclear foci, including DNA repair centers	O	+
YDL070W	BDF2	Protein involved in transcription initiation; acts at TATA-containing promoters; associates with the basal transcription factor TFIID; contains two bromodomains; corresponds to the C-terminal region of mammalian TAF1; redundant with Bdf1p; protein abundance increases in response to DNA replication stress; BDF2 has a paralog, BDF1, that arose from the whole genome duplication	O	++
YDL113C	ATG20	Sorting nexin family member required for the cytoplasm-to-vacuole targeting (Cvt) pathway and for endosomal sorting; has a Phox homology domain that binds phosphatidylinositol-3-phosphate; interacts with Snx4p; potential Cdc28p substrate	P	+
YDL115C	IWR1	RNA polymerase II transport factor, conserved from yeast to humans; also has a role in transporting RNA polymerase III into the nucleus; interacts with most of the RNAP II subunits; nucleo-cytoplasmic shuttling protein; deletion causes hypersensitivity to K1 killer toxin; protein increases in abundance and relocates from nucleus to cytoplasm upon DNA replication stress	O	+
YDL119C		Putative mitochondrial transport protein; GFP-fusion protein is induced in response to the DNA-damaging agent MMS; the authentic, non-tagged protein is detected in purified mitochondria	O	+

YDL137W	ARF2	ADP-ribosylation factor; GTPase of the Ras superfamily involved in regulation of coated formation vesicles in intracellular trafficking within the Golgi; ARF2 has a paralog, ARF1, that arose from the whole genome duplication	P	+
YDL155W	CLB3	B-type cyclin involved in cell cycle progression; activates Cdc28p to promote the G2/M transition; may be involved in DNA replication and spindle assembly; accumulates during S phase and G2, then targeted for ubiquitin-mediated degradation; relative distribution to the nucleus increases upon DNA replication stress; CLB3 has a paralog, CLB4, that arose from the whole genome duplication	O	+++
YDL167C	NRP1	Putative RNA binding protein of unknown function; localizes to stress granules induced by glucose deprivation; predicted to be involved in ribosome biogenesis	O	+
YDR042C		Putative protein of unknown function; expression is increased in ssu72-ts69 mutant	O	+
YDR129C	SAC6	Fimbrin, actin-bundling protein; cooperates with Scp1p (calponin/transgelin) in the organization and maintenance of the actin cytoskeleton; relocates from plasma membrane to cytoplasm upon DNA replication stress	O	--
YDR276C	PMP3	Small plasma membrane protein related to a family of plant polypeptides that are overexpressed under high salt concentration or low temperature, not essential for viability, deletion causes hyperpolarization of the plasma membrane potential	O	-
YDR314C	RAD34	Protein involved in nucleotide excision repair (NER); homologous to RAD4	O	+
YDR335W	MSN5	Karyopherin; involved in nuclear import and export of proteins, including import of replication protein A and export of Far1p and transcription factors Swi6p, Msn2p, and Pho4p; required for re-export of mature tRNAs after their retrograde import from the cytoplasm; exportin-5 homolog	O	+
YDR384C	ATO3	Plasma membrane protein, putative ammonium transporter; regulation pattern suggests a possible role in export of ammonia from the cell; phosphorylated in mitochondria; member of the TC 9.B.33 YaaH family of putative transporters	P	+
YDR388W	RVS167	Actin-associated protein with roles in endocytosis and exocytosis; interacts with Rvs161p to regulate actin cytoskeleton, endocytosis, and viability following starvation or osmotic stress; recruited to bud tips by Gyl1p and Gyp5p during polarized growth; homolog of mammalian amphiphysin	O	--
YDR448W	ADA2	Transcription coactivator; component of the ADA and SAGA transcriptional adaptor/HAT (histone acetyltransferase) complexes	P	+++
YDR451C	YHP1	Homeobox transcriptional repressor; binds Mcm1p and early cell cycle box (ECB) elements of cell cycle regulated genes, thereby restricting ECB-mediated transcription to the M/G1 interval; YHP1 has a paralog, YOX1, that arose from the whole genome duplication	O	+++
YDR463W	STP1	Transcription factor; undergoes proteolytic processing by SPS (Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p)-sensor component Ssy5p in response to extracellular amino acids; activates transcription of amino acid permease genes and may have a role in tRNA processing; STP1 has a paralog, STP2, that arose from the whole genome duplication	O	++
YEL043W		Predicted cytoskeleton protein involved in intracellular signalling based on quantitative analysis of protein-protein interaction maps; may interact with ribosomes, based on co-purification studies; contains fibronectin type III domain fold	P	+
YER031C	YPT31	Rab family GTPase; involved in the exocytic pathway; mediates intra-Golgi traffic or the budding of post-Golgi vesicles from the trans-Golgi; YPT31 has a paralog, YPT32, that arose from the whole genome duplication	P	+
YER055C	HIS1	ATP phosphoribosyltransferase; a hexameric enzyme, catalyzes the first step in histidine biosynthesis; mutations cause histidine auxotrophy and sensitivity to Cu, Co, and Ni salts; transcription is regulated by general amino acid control	P	+++
YER067C-A		Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data; partially overlaps the uncharacterized ORF YER067W	P	+
YER071C	TDA2	Protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm in a punctate pattern; null mutant is sensitive to expression of the top1-T722A allele	P	+/-
YER106W	MAM1	Monopolin; kinetochore associated protein involved in chromosome attachment to meiotic spindle	P	+
YER116C	SLX8	Subunit of Slx5-Slx8 SUMO-targeted ubiquitin ligase (STUbL) complex; stimulated by prior attachment of SUMO to the substrate; contains a C-terminal RING domain; forms nuclear foci upon DNA replication stress	O	-
YER149C	PEA2	Coiled-coil polarisome protein; required for polarized morphogenesis, cell fusion, and low affinity Ca2+ influx; forms polarisome complex with Bni1p, Bud6p, and Spa2p; localizes to sites of polarized	O	+
YER155C	BEM2	Rho GTPase activating protein (RhoGAP); involved in the control of cytoskeleton organization and cellular morphogenesis; required for bud emergence; potential GAP for Rho4p	O	-
YER183C	FAU1	5,10-methylenetetrahydrofolate synthetase, involved in folic acid biosynthesis	P	+
YER186C		Putative protein of unknown function	P	+
YFL001W	DEG1	tRNA:pseudouridine synthase; introduces pseudouridines at position 38 or 39 in tRNA, important for maintenance of translation efficiency and normal cell growth, localizes to both the nucleus and cytoplasm; non-essential for viability	O	+
YFR017C	IGD1	Cytoplasmic protein that inhibits Gdb1p glycogen debranching activity; required for normal intracellular accumulation of glycogen; phosphorylated in vivo; expression increases during wine fermentation; protein abundance increases in response to DNA replication stress; IGD1 has a paralog, YOL024W, that arose from the whole genome duplication	O	++
YGL035C	MIG1	Transcription factor involved in glucose repression; sequence specific DNA binding protein containing two Cys2His2 zinc finger motifs; regulated by the SNF1 kinase and the GLC7 phosphatase; regulates filamentous growth along with Mig2p in response to glucose depletion	O	+
YGL045W	RIM8	Protein involved in proteolytic activation of Rim101p in response to alkaline pH; interacts with ESCRT-1 subunits Stp22p and Vps28p; essential for anaerobic growth; member of the arrestin-related trafficking adaptor family	O	-

YGL070C	RPB9	RNA polymerase II subunit B12.6; contacts DNA; mutations affect transcription start site selection and fidelity of transcription	P	+
YGL072C		Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data; partially overlaps the verified gene HSF1; null mutant displays increased resistance to antifungal agents gliotoxin, cycloheximide and H ₂ O ₂	O	+++
YGL081W		Putative protein of unknown function; non-essential gene; interacts genetically with CHS5, a gene involved in chitin biosynthesis	O	+
YGL101W		Protein of unknown function; non-essential gene; interacts with the DNA helicase Hpr5p; YGL101W has a paralog, YBR242W, that arose from the whole genome duplication	O	+
YGL109W		Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data; overlaps the uncharacterized gene YGL108C	O	++
YGL133W	ITC1	Subunit of ATP-dependent Isw2p-Itc1p chromatin remodeling complex; required for repression of a-specific genes, repression of early meiotic genes during mitotic growth, and repression of INO1; similar to mammalian Acl1p, the regulatory subunit of the mammalian ATP-utilizing chromatin assembly and modifying factor (ACF) complex; ITC1 has a paralog, YPL216W, that arose from the whole genome duplication	O	++
YGL173C	XRN1	Evolutionarily-conserved 5'-3' exonuclease; component of cytoplasmic processing (P) bodies involved in mRNA decay; plays a role in microtubule-mediated processes, filamentous growth, ribosomal RNA maturation, and telomere maintenance; activated by the scavenger decapping enzyme Dcs1p	O	++
YGL180W	ATG1	Protein serine/threonine kinase; required for vesicle formation in autophagy and the cytoplasm-to-vacuole targeting (Cvt) pathway; structurally required for phagophore assembly site formation; during autophagy forms a complex with Atg13p and Atg17p; essential for cell cycle progression from G2/M to G1 under nitrogen starvation	O	+
YGL200C	EMP24	Component of the p24 complex; binds to GPI anchor proteins and mediates their efficient transport from the ER to the Golgi; integral membrane protein that associates with endoplasmic reticulum-derived COPII-coated vesicles	O	+
YGL226W	MTC3	Protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the mitochondrion; mtc3 is synthetically sick with cdc13-1	O	-
YGL254W	FZF1	Transcription factor involved in sulfite metabolism; sole identified regulatory target is SSU1; overexpression suppresses sulfite-sensitivity of many unrelated mutants due to hyperactivation of SSU1, contains five zinc fingers; protein abundance increases in response to DNA replication stress	O	++
YGR003W	CUL3	Ubiquitin-protein ligase; forms a complex with Elc1p that polyubiquitylates monoubiquitylated RNA polymerase II to trigger its proteolysis; cullin family member with similarity to Cdc53p and human CUL3	O	+
YGR111W		Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to both the cytoplasm and the nucleus	O	++
YGR259C		Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data; overlaps almost completely with the verified ORF TNA1/YGR260W	P	+
YGR284C	ERV29	Protein localized to COPII-coated vesicles; involved in vesicle formation and incorporation of specific secretory cargo; protein abundance increases in response to DNA replication stress	P	+++
YHL005C		Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data; partially overlaps the verified ORF YHL004W	O	-
YHR132W-A	IGO2	Protein required for initiation of G0 program; prevents degradation of nutrient-regulated mRNAs via the 5'-3' mRNA decay pathway; phosphorylated by Rim15p; GFP protein localizes to the cytoplasm and nucleus; IGO2 has a paralog, IGO1, that arose from the whole genome duplication	P	+
YHR184W	SSP1	Protein involved in the control of meiotic nuclear division and coordination of meiosis with spore formation; transcription is induced midway through meiosis	P	+
YIL009W	FAA3	Long chain fatty acyl-CoA synthetase; activates imported fatty acids; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cell periphery	P	+
YIL014C-A		Putative protein of unknown function	P	+
YIL018W	RPL2B	Ribosomal 60S subunit protein L2B; homologous to mammalian ribosomal protein L2 and bacterial L2; RPL2B has a paralog, RPL2A, that arose from the whole genome duplication; expression is upregulated at low temperatures	P	+++
YIL042C	PKP1	Mitochondrial protein kinase involved in negative regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by phosphorylating the ser-133 residue of the Pda1p subunit; acts in concert with kinase Pkp2p and phosphatases Ptc5p and Ptc6p	P	++
YIL093C	RSM25	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit	P	+++
YIL110W	HPM1	AdoMet-dependent methyltransferase involved in a novel 3-methylhistidine modification of ribosomal protein Rpl3p; seven beta-strand MTase family member; null mutant exhibits a weak vacuolar protein sorting defect and caspofungin resistance	O	-
YIR004W	DJP1	Cytosolic J-domain-containing protein; required for peroxisomal protein import and involved in peroxisome assembly, homologous to E. coli DnaJ	P	+
YIR009W	MSL1	U2B component of U2 snRNP; involved in splicing, binds the U2 snRNA stem-loop IV in vitro but requires association of Lea1p for in vivo binding; does not contain the conserved C-terminal RNA binding domain found in other family members	P	+++
YIR037W	HYR1	Thiol peroxidase; functions as a hydroperoxide receptor to sense intracellular hydroperoxide levels and transduce a redox signal to the Yap1p transcription factor; HYR1 has a paralog, GPX1, that arose from the whole genome duplication	P	+
YJL007C		Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data	O	++

YJL129C	TRK1	Component of the Trk1p-Trk2p potassium transport system; 180 kDa high affinity potassium transporter; phosphorylated in vivo and interacts physically with the phosphatase Ppz1p, suggesting Trk1p activity is regulated by phosphorylation; TRK1 has a paralog, TRK2, that arose from the whole genome duplication	O	+++
YJL140W	RPB4	RNA polymerase II subunit B32; forms two subunit dissociable complex with Rpb7p; involved in recruitment of 3'-end processing factors to transcribing RNA polymerase II complex and in export of mRNA to cytoplasm under stress conditions; also involved in translation initiation	O	+
YJL147C		Mitochondrial protein of unknown function; homozygous diploid deletion strain has a sporulation defect characterized by elevated dihydroxyacetone in the soluble fraction; expression induced by calcium shortage; YJL147W is a non-essential gene	O	+
YJL169W		Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data; partially overlaps the verified gene YJL168C/SET2	P	-
YJL172W	CPS1	Vacuolar carboxypeptidase S; expression is induced under low-nitrogen conditions	O	+
YJL179W	PFD1	Subunit of heterohexameric prefoldin; prefoldin binds cytosolic chaperonin and transfers target proteins to it; involved in the biogenesis of actin and of alpha- and gamma-tubulin	P	+++
YJR055W	HIT1	Protein of unknown function; required for growth at high temperature	O	++
YJR100C	AIM25	Putative protein of unknown function; non-tagged protein is detected in purified mitochondria in high-throughput studies; similar to murine NOR1; null mutant is viable and displays elevated frequency of mitochondrial genome loss	P	+
YJR117W	STE24	Highly conserved zinc metalloprotease that functions in two steps of a-factor maturation, C-terminal CAAX proteolysis and the first step of N-terminal proteolytic processing; contains multiple transmembrane spans	P	+++
YKL017C	HCS1	Hexameric DNA polymerase alpha-associated DNA helicase A involved in lagging strand DNA synthesis; contains single-stranded DNA stimulated ATPase and dATPase activities; replication protein A stimulates helicase and ATPase activities	P	+
YKL034W	TUL1	Subunit of the DSC ubiquitin ligase complex; golgi-localized RING-finger ubiquitin ligase (E3) involved in sorting polar transmembrane domain containing membrane proteins to multivesicular bodies for delivery to the vacuole; proposed involvement in the quality control of misfolded TMD containing proteins; ortholog of fission yeast dsc1	O	+
YKL041W	VPS24	One of four subunits of the endosomal sorting complex required for transport III (ESCRT-III); forms an ESCRT-III subcomplex with Did4p; involved in the sorting of transmembrane proteins into the multivesicular body (MVB) pathway	O	-
YKL066W		Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data; not conserved in closely related Saccharomyces species; partially overlaps the verified gene YNK1	O	+
YKL157W	APE2	Aminopeptidase yscII; may have a role in obtaining leucine from dipeptide substrates; APE2 has a paralog, AAP1, that arose from the whole genome duplication	O	+
YKL215C	OXPI	5-oxoprolinase; enzyme is ATP-dependent and functions as a dimer; similar to mouse Oplah gene; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm; protein abundance increases in response to DNA replication stress	P	+
YKR035W-A	DID2	Class E protein of the vacuolar protein-sorting (Vps) pathway; binds Vps4p and directs it to dissociate ESCRT-III complexes; forms a functional and physical complex with Ist1p; human ortholog may be altered in breast tumors	P	+
YKR076W	ECM4	Omega class glutathione transferase; not essential; similar to Ygr154cp; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm	P	++
YLR025W	SNF7	One of four subunits of the endosomal sorting complex required for transport III (ESCRT-III); involved in the sorting of transmembrane proteins into the multivesicular body (MVB) pathway; recruited from the cytoplasm to endosomal membranes	O	--
YLR034C	SMF3	Putative divalent metal ion transporter involved in iron homeostasis; transcriptionally regulated by metal ions; member of the Nramp family of metal transport proteins; protein abundance increases in response to DNA replication stress	P	+
YLR042C		Protein of unknown function; localizes to the cytoplasm; YLR042C is not an essential gene	P	+
YLR077W	FMP25	Mitochondrial inner membrane protein required for an early step in assembly of respiratory complex III (cytochrome bc1 complex); mRNA is targeted to mitochondria	P	++
YLR097C	HRT3	Putative SCF-ubiquitin ligase F-box protein; based on both genetic and physical interactions and sequence similarity; identified in association with Cdc53p, Skp1p and Ubi4 in large and small-scale studies	P	+
YLR149C		Protein of unknown function; overexpression causes a cell cycle delay or arrest; null mutation results in a decrease in plasma membrane electron transport; YLR149C is not an essential gene; protein abundance increases in response to DNA replication stress	P	+++
YLR279W		Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data	P	+
YLR283W		Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to mitochondria; YLR283W is not an essential gene	P	+
YLR289W	GUF1	Mitochondrial matrix GTPase that associates with mitochondrial ribosomes; important for translation under temperature and nutrient stress; may have a role in translational fidelity; similar to bacterial LepA elongation factor	P	+
YLR328W	NMA1	Nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase; catalyzes the transfer of the adenylyl moiety of ATP to nicotinamide mononucleotide to form NAD; involved in pathways of NAD biosynthesis, including the de novo, NAD(+) salvage, and nicotinamide riboside salvage pathways; NMA1 has a paralog, NMA2, that arose from the whole genome duplication	P	+

YLR343W	GAS2	1,3-beta-glucanotransferase, involved with Gas4p in spore wall assembly; has similarity to Gas1p	P	+
YML034W	SRC1	Inner nuclear membrane protein; functions in regulation of subtelomeric genes and is linked to TREX (transcription export) factors; SRC1 produces 2 splice variant proteins with different functions; alternative splicing of SRC1 pre-mRNA is promoted by Hub1p; mutant has aneuploidy tolerance; SEC1 has a <u>paralog, HEH2, that arose from the whole genome duplication</u>	P	+
YML055W	SPC2	Subunit of signal peptidase complex (Spc1p, Spc2p, Spc3p, Sec11p), which catalyzes cleavage of N-terminal signal sequences of proteins targeted to the secretory pathway; homologous to mammalian SPC25	P	+
YML081W	TDA9	Transcription factor that regulates acetate production; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the nucleus; null mutant is sensitive to expression of the top1-T722A allele; not an essential gene; TDA9 has a <u>paralog, RSF2, that arose from the whole genome duplication</u>	O	-
YML082W		Putative protein predicted to have carbon-sulfur lyase activity; transcriptionally regulated by Upc2p via an upstream sterol response element; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the nucleus and the cytoplasm; not an essential gene; YML082W has a <u>paralog, STR2, that arose from the whole genome duplication</u>	P	+
YML082W		Putative protein predicted to have carbon-sulfur lyase activity; transcriptionally regulated by Upc2p via an upstream sterol response element; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the nucleus and the cytoplasm; not an essential gene; YML082W has a <u>paralog, STR2, that arose from the whole genome duplication</u>	O	+
YML084W		Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data	P	+++
YML096W		Putative protein of unknown function with similarity to asparagine synthetases; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm; YML096W is not an essential gene and partially overlaps the verified gene RAD10	P	+
YML107C	PML39	Protein required for nuclear retention of unspliced pre-mRNAs along with Mlp1p and Pml1p; anchored to nuclear pore complex via Mlp1p and Mlp2p; found with the subset of nuclear pores farthest from the nucleolus; may interact with ribosomes	O	+
YML119W		Putative protein of unknown function; YML119W is not an essential gene; potential Cdc28p substrate	P	+
YMR060C	SAM37	Component of the Sorting and Assembly Machinery (SAM or TOB complex) of the mitochondrial outer membrane, which binds precursors of beta-barrel proteins and facilitates their outer membrane insertion; contributes to SAM complex stability	O	-
YMR071C	TVP18	Integral membrane protein localized to late Golgi vesicles along with the v-SNARE Tlg2p; may interact with ribosomes, based on co-purification experiments	P	+
YMR102C		Protein of unknown function; transcription is activated by paralogous transcription factors Yrm1p and Yrr1p along with genes involved in multidrug resistance; mutant shows increased resistance to azoles; not an essential gene; YMR102C has a <u>paralog, DGR2, that arose from the whole genome duplication</u>	P	+
YMR103C		Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data	P	+++
YMR114C		Protein of unknown function; may interact with ribosomes, based on co-purification experiments; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the nucleus and cytoplasm; YMR114C is not an essential gene	P	++
YMR123W	PKR1	V-ATPase assembly factor; functions with other V-ATPase assembly factors in the ER to efficiently assemble the V-ATPase membrane sector (V0); protein abundance increases in response to DNA replication stress	O	-
YMR133W	REC114	Protein involved in early stages of meiotic recombination; possibly involved in the coordination of recombination and meiotic division; mutations lead to premature initiation of the first meiotic division	P	+
YMR136W	GAT2	Protein containing GATA family zinc finger motifs; similar to Gln3p and Dal80p; expression repressed by leucine	P	+
YMR144W		Putative protein of unknown function; localized to the nucleus; YMR144W is not an essential gene	P	+
YMR153C-A		Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data; partially overlaps the verified gene NUP53	P	+
YMR160W		Protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the membrane of the vacuole; mutant has enhanced sensitivity to overexpression of mutant huntingtin; YMR160W is not an essential gene; relative distribution within the vacuolar membrane changes upon DNA replication stress	P	+
YMR169C	ALD3	Cytoplasmic aldehyde dehydrogenase; involved in beta-alanine synthesis; uses NAD ⁺ as the preferred coenzyme; very similar to Ald2p; expression is induced by stress and repressed by glucose	P	+
YMR170C	ALD2	Cytoplasmic aldehyde dehydrogenase; involved in ethanol oxidation and beta-alanine biosynthesis; uses NAD ⁺ as the preferred coenzyme; expression is stress induced and glucose repressed; very similar to Ald3p	P	+
YMR178W		Protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to both the cytoplasm and nucleus; YMR178W is not an essential gene; protein abundance increases in response to DNA replication stress	P	+
YMR183C	SSO2	Plasma membrane t-SNARE; involved in fusion of secretory vesicles at the plasma membrane; syntaxin homolog that is functionally redundant with Sso1p; SSO2 has a <u>paralog, SSO1, that arose from the whole genome duplication</u>	P	+
YMR195W	ICY1	Protein of unknown function; required for viability in rich media of cells lacking mitochondrial DNA; mutants have an invasive growth defect with elongated morphology; induced by amino acid starvation; ICY1 has a <u>paralog, ICY2, that arose from the whole genome duplication</u>	P	+

YMR199W	CLN1	G1 cyclin involved in regulation of the cell cycle; activates Cdc28p kinase to promote the G1 to S phase transition; late G1 specific expression depends on transcription factor complexes, MBF (Swi6p-Mbp1p) and SBF (Swi6p-Swi4p); CLN1 has a paralog, CLN2, that arose from the whole genome duplication	P	+
YMR244W		Putative protein of unknown function	P	+
YMR255W	GFD1	Coiled-coiled protein of unknown function; identified as a high-copy suppressor of a dbp5 mutation; protein abundance increases in response to DNA replication stress	P	+++
YMR273C	ZDS1	Protein with a role in regulating Swe1p-dependent polarized growth; involved in maintaining Cdc55p in the cytoplasm where it promotes mitotic entry; involved in mitotic exit through Cdc14p regulation; interacts with silencing proteins at telomeres; has a role in Bcy1p localization; implicated in mRNA nuclear export; ZDS1 has a paralog, ZDS2, that arose from the whole genome duplication	P	+++
YMR285C	NGL2	Protein involved in 5.8S rRNA processing; Ccr4p-like RNase required for correct 3'-end formation of 5.8S rRNA at site E; similar to Ngl1p; NGL2 has a paralog, NGL3, that arose from the whole genome duplication	P	+
YMR316C-A		Protein of unknown function; mRNA identified as translated by ribosome profiling data; overlaps the verified gene DIA1/YMR316W	O	+
YMR317W		Putative protein of unknown function with some similarity to sialidase from Trypanosoma; YMR317W is not an essential gene	P	+
YMR318C	ADH6	NADPH-dependent medium chain alcohol dehydrogenase; has broad substrate specificity; member of the cinnamyl family of alcohol dehydrogenases; may be involved in fusel alcohol synthesis or in aldehyde tolerance; protein abundance increases in response to DNA replication stress	P	+
YNL047C	SLM2	Phosphoinositide PI4,5P(2) binding protein, forms a complex with Slm1p; acts downstream of Mss4p in a pathway regulating actin cytoskeleton organization in response to stress; phosphorylated by the TORC2 complex; SLM2 has a paralog, SLM1, that arose from the whole genome duplication	P	+
YNL084C	END3	EH domain-containing protein involved in endocytosis; actin cytoskeletal organization and cell wall morphogenesis; forms a complex with Sla1p and Pan1p	O	-
YNL096C	RPS7B	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit; interacts with Kti11p; deletion causes hypersensitivity to zymocin; homologous to mammalian ribosomal protein S7, no bacterial homolog; RPS7B has a paralog, RPS7A, that arose from the whole genome duplication; protein abundance increases in response to DNA replication stress	P	+
YNL104C	LEU4	Alpha-isopropylmalate synthase (2-isopropylmalate synthase); the main isozyme responsible for the first step in the leucine biosynthesis pathway; LEU4 has a paralog, LEU9, that arose from the whole genome duplication	O	+
YNL105W	RRT16	Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data; partially overlaps verified gene INP52; identified in a screen for mutants with decreased levels of rDNA transcription	P	+
YNL128W	TEP1	PTEN homolog with no demonstrated inositol lipid phosphatase activity; plays a role in normal sporulation; homolog of human tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 and fission yeast ptn1	P	+
YNL146W		Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the endoplasmic reticulum; YNL146W is not an essential gene	P	+
YNL168C	FMP41	Putative protein of unknown function; GFP-fusion protein is induced in response to the DNA-damaging agent MMS; the authentic, non-tagged protein is detected in highly purified mitochondria in high-throughput studies	P	-
YNL242W	ATG2	Peripheral membrane protein required for autophagic vesicle formation; also required for vesicle formation during pexophagy and the cytoplasm-to-vacuole targeting (Cvt) pathway; involved in Atg9p cycling between the phagophore assembly site and mitochondria; essential for cell cycle progression from G2/M to G1 under nitrogen starvation; forms cytoplasmic foci upon DNA replication stress	O	+
YNL273W	TOF1	Subunit of a replication-pausing checkpoint complex; Tof1p-Mrc1p-Csm3p acts at the stalled replication fork to promote sister chromatid cohesion after DNA damage, facilitating gap repair of damaged DNA; interacts with the MCM helicase; relocalizes to the cytosol in response to hypoxia	P	+
YNL278W	CAF120	Part of the CCR4-NOT transcriptional regulatory complex; involved in controlling mRNA initiation, elongation, and degradation; CAF120 has a paralog, SKG3, that arose from the whole genome duplication	P	+
YNL289W	PCL1	Cyclin, interacts with cyclin-dependent kinase Pho85p; member of the Pcl1,2-like subfamily; involved in the regulation of polarized growth and morphogenesis and progression through the cell cycle; is ubiquitinated by Dma1p; phosphorylation by Pho85p targets it for degradation; localizes to sites of polarized cell growth	P	+
YNL329C	PEX6	AAA-peroxin that heterodimerizes with AAA-peroxin Pex1p and participates in the recycling of peroxisomal signal receptor Pex5p from the peroxisomal membrane to the cytosol	P	+
YNL334C	SNO2	Protein of unknown function; nearly identical to Sno3p; expression is induced before the diauxic shift and also in the absence of thiamin	P	+
YNL338W		Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data; completely overlaps TEL14L-XC, which is a telomeric X element core sequence on the left arm of chromosome XIV	P	++
YNR071C		Putative aldose 1-epimerase	O	++
YNR074C	AIF1	Mitochondrial cell death effector that translocates to the nucleus in response to apoptotic stimuli, homolog of mammalian Apoptosis-Inducing Factor, putative reductase	P	+
YOL015W	IRC10	Putative protein of unknown function; null mutant displays increased levels of spontaneous Rad52p foci	O	+

YOL045W	PSK2	PAS-domain containing serine/threonine protein kinase; regulates sugar flux and translation in response to an unknown metabolite by phosphorylating Ugp1p and Gsy2p (sugar flux) and Caf20p, Tif11p and Sro9p (translation); PSK2 has a paralog, PSK1, that arose from the whole genome duplication	P	+++
YOL052C	SPE2	S-adenosylmethionine decarboxylase; required for the biosynthesis of spermidine and spermine; cells lacking Spe2p require spermine or spermidine for growth in the presence of oxygen but not when grown anaerobically	O	+++
YOL059W	GPD2	NAD-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase; expression is controlled by an oxygen-independent signaling pathway required to regulate metabolism under anoxic conditions; located in cytosol and mitochondria; constitutively active but is inactivated via phosphorylation by energy-stress responsive kinase SNF1; GPD2 has a paralog, GPD1, that arose from the whole genome duplication	P	+
YOL067C	RTG1	Transcription factor (bHLH) involved in interorganelle communication between mitochondria, peroxisomes, and nucleus	P	-
YOL070C	NBA1	Protein of unknown function; localizes to the bud neck and cytoplasm; interacts with Nap1p; may interact with ribosomes, based on co-purification experiments; potential Cdc28p substrate	P	+
YOL084W	PHM7	Protein of unknown function; expression is regulated by phosphate levels; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cell periphery and vacuole; protein abundance increases in response to DNA replication stress	P	+
YOL129W	VPS68	Vacuolar membrane protein of unknown function involved in vacuolar protein sorting; also detected in the mitochondria	O	+
YOL163W		Putative protein of unknown function; member of the Dal5p subfamily of the major facilitator family	O	+
YOR006C	TSR3	Protein required for 20S pre-rRNA processing; involved in processing of the 20S pre-rRNA at site D to generate mature 18S rRNA; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to both the cytoplasm and the nucleus; relative distribution to the nucleus increases upon DNA replication stress	P	+++
YOR043W	WHI2	Protein required, with binding partner Psr1p, for full activation of the general stress response, possibly through Msn2p dephosphorylation; regulates growth during the diauxic shift; negative regulator of G1 cyclin expression	O	+
YOR071C	NRT1	High-affinity nicotinamide riboside transporter; also transports thiamine with low affinity; shares sequence similarity with Thi7p and Thi72p; proposed to be involved in 5-fluorocytosine sensitivity	P	+
YOR080W	DIA2	Origin-binding F-box protein; forms SCF ubiquitin ligase complex with Skp1p and Cdc53p; required to target Cdc6p for ubiquitin-mediated destruction during G1 phase; required for deactivation of Rad53 checkpoint kinase, completion of DNA replication during recovery from DNA damage; required for assembly of RSC complex, RSC-mediated transcription regulation, and nucleosome positioning; involved in invasive and pseudohyphal growth	O	+
YOR096W	RPS7A	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit; interacts with Kti11p; deletion causes hypersensitivity to zymocin; homologous to mammalian ribosomal protein S7, no bacterial homolog; RPS7A has a paralog, RPS7B, that arose from the whole genome duplication	O	-
YOR156C	NFI1	SUMO E3 ligase; catalyzes the covalent attachment of SUMO (Smt3p) to proteins; primary E3 ligase for Sir4p; sumoylates Yku70p/Yku80p and Sir4p in vivo to promote chromatin anchoring; promotes telomere anchoring to the nuclear envelope; involved in maintenance of proper telomere length; NFI1 has a paralog, SIZ1, that arose from the whole genome duplication	P	+
YOR263C		Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data; partially overlaps the verified ORF DES3/YOR264W	P	+
YOR296W		Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm; expressed during copper starvation; YOR296W is not an essential gene	O	+++
YOR298C-A	MBF1	Transcriptional coactivator; bridges the DNA-binding region of Gcn4p and TATA-binding protein Spt15p; suppressor of frameshift mutations; protein abundance increases in response to DNA replication stress	P	+++
YOR303W	CPA1	Small subunit of carbamoyl phosphate synthetase; carbamoyl phosphate synthetase catalyzes a step in the synthesis of citrulline, an arginine precursor; translationally regulated by an attenuator peptide encoded by YOR302W within the CPA1 mRNA 5'-leader	P	+
YOR317W	FAA1	Long chain fatty acyl-CoA synthetase; activates imported fatty acids with a preference for C12:0-C16:0 chain lengths; functions in long chain fatty acid import; accounts for most acyl-CoA synthetase activity; localized to lipid particles; involved in sphingolipid-to-glycerolipid metabolism; forms ER foci upon DNA replication stress; FAA1 has a paralog, FAA4, that arose from the whole genome duplication	O	+
YOR338W		Putative protein of unknown function; YOR338W transcription is regulated by Azf1p and its transcript is a specific target of the G protein effector Scp160p; identified as being required for sporulation in a high-throughput mutant screen; YOR338W has a paralog, FUN19, that arose from the whole genome duplication	P	+
YOR348C	PUT4	Proline permease; required for high-affinity transport of proline; also transports the toxic proline analog azetidine-2-carboxylate (AzC); PUT4 transcription is repressed in ammonia-grown cells	P	+
YOR360C	PDE2	High-affinity cyclic AMP phosphodiesterase; component of the cAMP-dependent protein kinase signaling system, protects the cell from extracellular cAMP, contains readthrough motif surrounding termination codon	O	++
YPL041C		Protein of unknown function involved in maintenance of proper telomere length	O	+
YPL057C	SUR1	Mannosylinositol phosphorylceramide (MIPC) synthase catalytic subunit; forms a complex with regulatory subunit Csg2p; function in sphingolipid biosynthesis is overlapping with that of Csh1p; SUR1 has a paralog, CSH1, that arose from the whole genome duplication	P	+
YPL087W	YDC1	Alkaline dihydroceramidase, involved in sphingolipid metabolism; preferentially hydrolyzes dihydroceramide to a free fatty acid and dihydrosphingosine; has a minor reverse activity; YDC1 has a paralog, YPC1, that arose from the whole genome duplication	P	+

YPL103C	FMP30	Mitochondrial inner membrane protein with a role in maintaining mitochondrial morphology and normal cardiolipin levels; proposed to be involved in N-acyl ethanolamine metabolism; related to mammalian N-acylPE-specific phospholipase D	O	+++
YPL134C	ODC1	Mitochondrial inner membrane transporter; exports 2-oxoadipate and 2-oxoglutarate from the mitochondrial matrix to the cytosol for lysine and glutamate biosynthesis and lysine catabolism; suppresses, in multicopy, an <i>fmc1</i> null mutation; ODC1 has a paralog, ODC2, that arose from the whole genome duplication	O	+
YPL178W	CBC2	Small subunit of the heterodimeric cap binding complex with Sto1p; interacts with Npl3p, possibly to package mRNA for export from the nucleus; may have a role in telomere maintenance; contains an RNA-binding motif	P	+++
YPL192C	PRM3	Pheromone-regulated protein required for nuclear envelope fusion during karyogamy; localizes to the outer face of the nuclear membrane; interacts with Kar5p at the spindle pole body	O	+
YPL200W	CSM4	Protein required for accurate chromosome segregation during meiosis; involved in meiotic telomere clustering (bouquet formation) and telomere-led rapid prophase movements; CSM4 has a paralog, MPS2, that arose from the whole genome duplication	P	+++
YPL239W	YAR1	Ankyrin-repeat containing, nucleocytoplasmic shuttling chaperone; prevents aggregation of Rps3p in the cytoplasm, associates with free Rps3p in the cytoplasm and delivers it to the 90S in the nucleus; required for 40S ribosomal subunit export, biogenesis and adaptation to osmotic and oxidative stress; expression repressed by heat shock	P	+++
YPL247C		Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm and nucleus; similar to the petunia WD repeat protein an11; overexpression causes a cell cycle delay or arrest	O	+++
YPL257W		Putative protein of unknown function; homozygous diploid deletion strain exhibits low budding index; physically interacts with Hsp82p; YPL257W is not an essential gene	P	+
YPL270W	MDL2	Mitochondrial inner membrane half-type ATP-binding cassette (ABC) transporter, required for respiratory growth at high temperature; similar to human TAP1 and TAP2 implicated in bare lymphocyte syndrome and Wegener-like granulomatosis	O	+
YPR024W	YME1	Catalytic subunit of the mitochondrial inner membrane i-AAA protease complex, which is responsible for degradation of unfolded or misfolded mitochondrial gene products; serves as a nonconventional translocation motor to pull PNPase into the intermembrane space; also has a role in intermembrane space protein folding; mutation causes an elevated rate of mitochondrial turnover	O	+
YPR054W	SMK1	Middle sporulation-specific mitogen-activated protein kinase (MAPK) required for production of the outer spore wall layers; negatively regulates activity of the glucan synthase subunit Gsc2p	P	+
YPR101W	SNT309	Member of the NineTeen Complex (NTC) that contains Prp19p and stabilizes U6 snRNA in catalytic forms of the spliceosome containing U2, U5, and U6 snRNAs; interacts physically and genetically with Prp19p	O	+++
YPR129W	SCD6	Repressor of translation initiation; binds eIF4G through its RGG domain and inhibits recruitment of the preinitiation complex; also contains an Lsm domain; may have a role in RNA processing; overproduction suppresses null mutation in clathrin heavy chain gene CHC1; forms cytoplasmic foci upon DNA replication stress	P	+++
YPR151C	SUE1	Mitochondrial protein required for degradation of unstable forms of cytochrome c	P	+
YPR152C	URN1	Putative protein of unknown function containing WW and FF domains; overexpression causes accumulation of cells in G1 phase	P	+
YPR158W	CUR1	Sorting factor, central regulator of spatial protein quality control; physically and functionally interacts with chaperones to promote sorting and deposition of misfolded proteins into cytosolic compartments; involved in destabilization of [URE3] prions; CUR1 has a paralog, BTN2, that arose from the whole genome duplication	P	+

II. Revue : « Yeast as a model for Alzheimer's disease: Latest studies and advanced strategies »

Yeast as a model for Alzheimer's disease: Latest studies and advanced strategies.

Mathias Verduyckt¹, Hélène Vignaud², Tine Bynens¹, Vanessa Franssens¹, Christophe Cullin², Joris Winderickx¹

Functional Biology, KU Leuven, Kasteelpark Arenberg 31, 3001 Heverlee, Belgium

Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS UMR 5095, Université Bordeaux 2

Victor Segalen, 33077 Bordeaux, France

Abstract

In the past, studies using *Saccharomyces cerevisiae*, a unicellular eukaryotic model, have enabled major breakthroughs in our understanding of a plethora of cellular and molecular processes. Today, a “re-invention” of its use in fundamental and applied research is paving the way for a better understanding of the mechanisms causing neurodegeneration. The rise of neurodegenerative diseases is becoming increasingly problematic in our ageing society. Most prevalent is Alzheimer's disease (AD), affecting more than 35 million people worldwide [1] and causing an enormous burden, both on a personal and a communal level. The disease is characterized by two major pathological hallmarks, being extracellular amyloid plaques consisting mainly of A β peptides and intracellular neurofibrillary tangles (NFTs) consisting of hyperphosphorylated tau protein. Despite the huge importance of thoroughly understanding the underlying molecular mechanisms of neurodegeneration, progress has been slow. However, multiple complementary research methods are proving their worth, not in the least work done with *S. cerevisiae*, which combines well-established and fast genetic and molecular techniques with an ability to faithfully capture key aspects of neurodegeneration. In this review chapter, we focus on the considerable progress that has been made using yeast as a

model system for AD.

Yeast as a model system

Historically, *Saccharomyces cerevisiae*, also known as baker's and budding yeast, has proven to be instrumental in deciphering mechanisms behind a variety of important and conserved cellular and molecular pathways. These cellular processes include the regulation of the cell cycle, the secretory pathway, mitochondrial biology, gene interactions and recombination. In 1996, it was the first eukaryote to have its genome fully sequenced, a genome which proved to be very condense, with 6600 ORFs (open reading frames) annotated to date [2-4]. By comparison, the human genome features three to five times as many genes, however, the human genome is also more than 200 times longer. Sixty percent of yeast genes show significant homology to human genes, or have at least one conserved domain, often implicated in signal transduction or specific metabolic processes [5]. Furthermore, approximately thirty percent of genes known to be implicated in human disease have a yeast ortholog [6]. Since the publication of the genome sequence, an enormous wealth of genome-wide information has become easily accessible in corresponding databases (Table 1), and paved the way for *S. cerevisiae* to become the eukaryotic model of choice for the development of genomic technology.

Database or search	URL
General yeast genome and proteome databases	
Saccharomyces Genome Database (SGD Stanford)	http://www.yeastgenome.org/
Comprehensive Yeast Genome Database (CYGD-MIPS)	http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast/index.jsp
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)	http://www.genome.jp/kegg/
Yeast mutant collections	
Saccharomyces Genome Deletion Project	http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/
EUROpean Saccharomyces Cerevisiae ARchive for Functional analysis (EUROSCARF)	http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/
Yeast-mammalian or yeast-human homology searches	
Mammalian homology to yeast (SGD)	http://www.yeastgenome.org/mammal/
Clusters of orthologous groups of proteins (COGs)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/
Discover homologs (Homologene)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene
Yeast-human diseases	
Yeast homologs of human disease-associated genes	http://mips.gsf.de/proj/yeast/reviews/human_diseases.html
Mitochondria-related proteins, genes and diseases (MitoP)	http://www.mitop.de:8080/mitop2/
Yeast proteome analysis	
Yeast Protein Localisation database (YPL.db)	http://ypl.uni-graz.at/pages/home.html
Yeast GFP Fusion Localization database (yeastgfp)	http://yeastgfp.yeastgenome.org/
Database of Interacting Proteins (DIP)	http://dip.doe-mbi.ucla.edu
Molecular Interactions Database (MINT)	http://160.80.34.4/mint/
Information Hyperlinked Over Proteins	http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/
Yeast expression analysis	
Princeton Microarray database	http://puma.princeton.edu/
Yeast Microarray Global Viewer (yMGV)	http://www.transcriptome.ens.fr/ymgv/
Yeast phenotypic analysis	
Saccharomyces cerevisiae Morphological Database (SCMD)	http://yeast.gi.k.u-tokyo.ac.jp/
PROfiling of PHEnotypic Characteristics in Yeast (PROPHECY)	http://prophecy.lundberg.gu.se/

Table 1: Websites of interest in yeast research

As an experimental model system, *Saccharomyces cerevisiae* offers a wide variety of approaches [7]. The available deletion and overexpression libraries make experiments designed to uncover genetic interactions easily accessible, as well as studies examining the involvement of certain genes in a variety of processes and physiological responses. Large scale studies especially benefit from these collections. On the proteomics level, protein interactions can be discovered using yeast-two-hybrid, TAP-TAG and co-

immunoprecipitation experiments, as well as protein microarrays. In this technique, nickel- or nitrocellulose-coated slides covered with tagged proteins can be used to distinguish protein-protein, protein-nucleic acid and protein-lipid interactions. Analysing protein localisations is facilitated by the ease of which GFP- or dsRed fusion proteins can be expressed in yeast. *Saccharomyces cerevisiae* is especially well suited for high throughput screening. The availability of deletion [8] and overexpression libraries [9, 10] in combination with highly automated research methods creates the possibility to quickly assess the effect of thousands of genes. A typical experimental design for discovering genes capable of modifying a toxic phenotype is shown in **Fig. 1**. *S. cerevisiae* was also the first organism where genome-wide transcriptional profiling was performed, using cDNA microarrays, thus allowing systematic large scale profiling of mRNA levels in a cell population [11]. The biological effects of small molecules can also be easily determined using yeast assays. A large amount of molecules can be tested simultaneously by utilizing automatized systems, while the yeast deletion collection can help clarify the role of certain genes in the effect of a given molecule [12, 13].

For a long time, the use of yeast in human disease-related research was constricted to disease genes with a direct homologue in yeast. Recently however, so-called humanized yeast models where human genes without a yeast homologue are introduced yeast cells are becoming implemented as a valuable research tool for deciphering underlying molecular causes of human disease [14-16]. In a research community where the use of a multitude of model systems is becoming more prevalent and accepted every day, the use of yeast to model complex human diseases is often still met with surprise or disbelief, even when the advantages of using yeast as an early screening tool are so apparent. And while it is true that *S. cerevisiae* is the most simple eukaryote, the conservation of essential pathways and genetic homology between yeast and human is to be considered. So far, yeast has contributed to the understanding of diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's

disease, amyotrophic lateral sclerosis (ALS), frontotemporal dementia and several tauopathies, among others.

Approaches to modeling A β toxicity in yeast

APP processing

Senile or amyloid plaques are the pathological hallmark of AD which have received the most attention. They consist mainly out of A β -peptides. These peptides are generated through the subsequent cleavage of the amyloid precursor protein (APP) by β - and γ -secretase, in the amyloidogenic pathway. Alternatively, APP can be processed via the non-amyloidogenic pathway, in which α -secretase cleaves APP inside the A β region (**Fig. 2**) [17]. APP is a type I transmembrane protein with putative functions related to signaling, cell adhesion and neuronal maturation and migration [18]. An iron-export ferroxidase function has been reported as well [19]. Processing by β -secretase releases the N-terminal ectodomain and leaves a membrane-bound C-terminal fragment called C99. This fragment can then be cleaved intramembraneously by γ -secretase (**Fig.3 A**) [20]. This cleavage is somewhat more promiscuous, and A β peptides ranging from 38 to 43 amino acids can be produced [21]. In healthy individuals, mainly A β_{40} is generated, but in AD, the balance between A β_{40} and A β_{42} is shifted in favour of the longer form, which is more hydrophobic and more prone to aggregation [22]. In familial AD, A β_{42} is present in greater amounts due to mutations in either APP or presenilin, the catalytic subunit of γ -secretase. Mutations in the A β part of APP can change its aggregation properties, another cause of familial AD [23].

Earlier research focused mainly on the extracellular amyloid plaques, but more recently attention has shifted towards the intracellular effects of A β_{42} [24]. APP is translocated in the ER and is transported through maturation in the Golgi complex to the plasma membrane. A

significant fraction of A β can be reinternalized, and evidence suggests APP processing can take place in the secretory and endosomal pathway as well [25, 26]. There still are a lot of questions regarding what the toxic species is, but toxicity has been reported from a range of soluble A β oligomers. The large extracellular plaques are mainly inert and considered to be less toxic, although it might represent a reservoir for soluble A β . Exactly how the toxic oligomers cause cellular distress remains unclear, but it is suggested the cytotoxicity might arise through inhibition of the proteasome [27], oxidative stress due to ROS production and damaged mitochondria [28, 29], changes in endocytic efficiency [30], disruption of Ca²⁺-signaling [31] and alterations to synaptic receptor levels and activity [32].

Initial yeast studies on A β focused on the processing of APP and C99. The first study from Zhang and colleagues expressed APP fused to the prepro- α -mating factor, which serves as a signal sequence, in a protease deficient yeast strain [33]. After Kex2-processing in the late-Golgi complex, cleaving off the α -factor, full-length APP could be detected. The researchers showed that APP underwent further processing, as an N-terminal ectodomain was released in the medium and a C-terminal fragment could be detected, the same size of the C-terminal fragment released by α -secretase cleavage in human cells. In a follow-up study, it was shown that two GPI-linked aspartyl proteases were responsible, Yap3 and Mkc7 [34]. Cleavage did not occur in mutants where transport from the ER to the Golgi was blocked. Experimental evidence supports an α -secretase-like activity, most likely processing APP in the late Golgi (**Fig. 3B**). No endogenous β - or γ -secretase activity was observed in yeast cells, but strains have been engineered where APP fragments could be cleaved by human β -secretase (BACE1) or a reconstituted γ -secretase complex. In case of BACE1, an APP fragment containing the β -site, the transmembrane domain and the C-terminal domain was fused to yeast invertase. Upon expression of β -secretase, growth could be restored on selective plates [35]. For γ -secretase, the C₁₋₅₅ fragment of APP was fused to the GAL4 transcription factor. Upon

expression of all four γ -secretase subunits, GAL4 was released and triggered the transcription and translation of β -galactosidase, which can easily be detected by assaying using ONPG (ortho-nitrophenyl- β -galactoside). β -galactosidase activity could only be detected when all four subunits were expressed [36].

The proteasome is able to remove aggregation-prone peptides from the cell, and as it is suggested that proteasomal activity is impaired in AD, Sparvero *et al.* assayed the processing of the C99 fragment both in wild type yeast, and in a yeast strain where two subunits of the proteasome were mutated, resulting in a severe impairment of its activity [37]. ZipTip immunocapture and mass spectrometry were used to analyze peptides reactive to an A β antibody. They found that when proteasomal activity is impaired, the proteomic fragment profiles of C99 were radically different, suggesting that other protein quality control mechanisms could compensate and act upon C99 (**Fig. 3C**). This response led to the production of peptides that were more hydrophobic and could thus aggregate more readily. Cells with a functioning proteasome showed a smaller number of fragments, which were generally less aggregation prone. Two larger, amyloidogenic species were however detected in the wild type yeast cells as well, so a small portion of proteasomal activity might contribute to the generation of toxic species.

A β toxicity

Up until recently, studies attempting to express native A β_{42} in *S. cerevisiae* failed to produce detectable levels of the peptide, either because of extremely rapid degradation or through counterselection due to A β -toxicity. It had already been reported that an A β -GFP fusion protein was able to slightly lower growth yield and induce a heat shock response in yeast. In 2011 however, two groups succeeded in making a yeast model capable of expressing the native A β peptide. Treusch *et al.* fused the KAR2 signal sequence to the N-terminus of the A β

sequence, codon optimized for expression in yeast (**Fig. 3D**) [38]. The function of KAR2 was to direct the peptide into the secretory pathway. As the yeast cell wall restrains any secreted peptides, A β remains in the periplasm and can interact with the plasma membrane and undergo endocytosis, trafficking through pathologically relevant cellular compartments. When expressed from a galactose-inducible multi-copy plasmid, A β caused a slight decrease in growth rate. In order to allow genetic screens, tandem copies of the construct were integrated in the genome, resulting in a robust cytotoxic effect, leading to a strain with impaired growth on galactose, without a major increase in lethality. An A β_{40} construct was created as control, this peptide was less toxic for yeast cells. The native peptide could be detected using western blotting, and unboiled samples revealed oligomers of A β_{42} , and significantly less oligomers of A β_{40} , indicating that as in neurons, oligomeric species contribute to cytotoxicity. An overexpression library of 5532 open reading frames (ORFs) was transformed into the A β_{42} screening strain, displaying an intermediate A β -toxicity, so that toxicity enhancers or suppressors could be identified easily. 17 enhancers and 23 suppressors were discovered, many of which showed sequence similarity to human genes. Twelve hits had clear human homologues, with three results involved in clathrin-mediated endocytosis and seven that were functionally associated with the cytoskeleton. Several of these genes had human homologues with a connection to AD risk factors, most notably the human homologue of YAP1802, PICALM, which is one of the most highly confirmed risk factors for sporadic AD [39, 40]. For selected hits, experiments have been carried out using transgenic *C. elegans* and rat cortical neurons. The outcome of these experiments supported results obtained from yeast, thus validating the model. Finally, the effect of A β_{42} on clathrin-mediated endocytosis was looked into, by analyzing the localization of the Ste3-YFP fusion protein. In control cells, this protein localizes to the lumen of the vacuole, while endocytosis in A β_{42} -expressing cells was severely perturbed, as Ste3-YFP could be found in several foci. Interestingly,

overexpression of three of the toxicity suppressor hits was in each case able to partially rescue the endocytic defect.

D'Angelo and colleagues were also able to validate a yeast model for A β ₄₂-induced cytotoxicity [41]. A fusion between the prepro- α -mating factor, A β ₄₂ and GFP caused clear and reproducible cytotoxicity (**Fig. 3F**). The α -mating factor-A β ₄₂ fusion without GFP was cytotoxic as well, but western blot analysis revealed the expression of this construct was significantly lower. GFP appears to stabilize A β , which is otherwise quickly broken down, but is not responsible for any observed cytotoxic effect. A fusion protein containing the Arctic mutant of A β ₄₂ showed an increase in toxicity when compared to wild type A β . The importance of trafficking through the secretory pathway was exemplified, as A β without prepro signal sequence did not cause any cytotoxicity. Interestingly, aggregates formed by A β with and without signal sequence appeared to be different, after filter-trap and fluorescent microscopic analysis. When expressed in the cytoplasm, without signal sequence, A β -GFP was distributed homogenously, and some foci could be seen (**Fig. 3E**). When expressed through the secretory pathway, there was no fluorescence at all, indicating that aggregation of the protein somehow obstructed GFP to fold into its native state. A linker between A β and GFP was able to restore fluorescence. Respiration rates were monitored in aerobic conditions, and it was shown that the presence of A β caused a decrease in oxygen consumption. As the mitochondrial content was unchanged, it is plausible that this decrease might arise from an inhibition of the electron transport chain. As Hsp104 has been reported to play an important role in handling Huntingtin aggregates in yeast [42], the researchers tested whether it would affect A β toxicity. Somewhat surprisingly, deletion of Hsp104 partially restored the growth defect caused by expression of A β . As Hsp104 is a cytoplasmic protein, this observation suggests that at least part of the A β peptides are able to escape the secretory pathway and end up in the cytosol. No fluorescent foci were observed in the *hsp104 Δ* strain, indicating that

Hsp104 has an effect on the aggregation properties of A β . Deletion of YAP1801 and YAP1802, the yeast homologues of human PICALM, caused a decrease in toxicity, and expression of mouse PICALM was able to partially restore the toxic phenotype observed after expression of A β in wild type yeast. This result is somewhat at odds with results obtained by Treusch *et al.*, where overexpression of YAP1802 rescued the cell from toxicity, due to an upregulation of endocytosis. This discrepancy might be due to a fundamental difference in both models: the model by Treusch *et al.* uses codon optimized tandem constructs integrated in the genome, which causes a very high production rate. D'Angelo *et al.* express their A β construct using a multi-copy plasmid, creating intermediate levels of A β . Another possibility is that PICALM might decrease toxicity when A β levels are very high, while increasing endocytosis leads to an inverse effect when the amount of A β is below a certain threshold. The fact that two different signal sequences are used might warrant for some different outcomes as well. Overall, both models clearly show how yeast can be used as a relevant tool for human disease research, replicating important pathological events as cytotoxicity, oligomerization and the involvement of genes with relevant human counterparts. In both cases, correct processing through the secretory pathway proved instrumental for A β to cause cytotoxicity in yeast.

A β aggregation

Yeast models have been used as well to specifically study A β oligomerization. A β was fused to the C-terminal part of Sup35p, an essential translation termination factor (**Fig. 3G**) [43]. Sup35p is a known yeast prion protein, and its aggregation state can easily be assayed using the nonsense allele *adel-14*, in which a premature stopcodon is introduced. Sup35p in its normal state will result in a truncated enzyme, rendering the cells unable to grow on synthetic medium without adenine. Additionally, they will accumulate a red intermediate of adenine biosynthesis when grown on complete medium. In its prion form [PSI⁺], the efficiency of

translation termination at the premature stop codon is impaired, so the cells gain the ability to grow on medium without adenine and stop producing the red intermediate pigment. The N-terminal part of Sup35p is responsible for its prion properties, but is not necessary for the essential function of the protein. By fusing A β to the essential C-terminal part of Sup35p, without the prion domain, an easy oligomerization assay was created, which has been used to discover specific point mutations which inhibited A β oligomerization. Furthermore, consistent with the results of D'Angelo *et al.*, the assay demonstrated that Hsp104 could interact with A β . Deletion of Hsp104 inhibited the oligomerization process. More recently, this assay has been used in a high-throughput screen in an effort to discover anti-oligomeric compounds [44]. A library of 12800 small molecules was tested, two of which were hits. These two compounds were subjected to further biochemical analysis, which confirmed the anti-oligomeric effect, validating this screening method as a reliable and cost-effective approach to these types of questions.

Yeast models for tau

The tau protein is a microtubule-associated protein involved in the stabilization and spacing of microtubules, which makes it an important factor in the regulation of axonal transport [45]. Apart from binding to microtubules, tau is also known to interact with other cellular components and enzymes, for example the plasma membrane [46, 47], actin filaments [48] and src tyrosine kinases like FYN [49-51]. Tau can exist in six different isoforms, arising from differential mRNA splicing. The isoforms differ in the presence or absence of two N-terminal inserts of which the function is still undetermined, and an additional repeat of a tubulin-binding motif in the microtubule-binding domain, affecting the ability of tau to stabilize microtubules [45]. The binding of tau to microtubules is largely regulated by

phosphorylation, and the interplay of various kinases and phosphatases creates a dynamic scenario where the stability of microtubules can be easily altered [52, 53]. On the longest tau isoform, 79 putative Ser/Thr phosphorylation sites can be found, and phosphorylation of 30 of these sites has already been reported. In AD, tau can be detected a variety of aggregated forms, including intracellular paired-helical fragments (PHFs) and neurofibrillary tangles (NFTs) [54]. Tau protein in these aggregates is hyperphosphorylated, an observation which has caused a lot of interest in tau phosphorylation studies [55]. This hyperphosphorylation changes the conformation of tau, facilitating oligomerization and aggregation (gain of function), and leading to the release of tau from microtubules, thus destabilizing them (loss of function) (**Fig. 4A**). In vitro studies support the notion that hyperphosphorylation of tau facilitates aggregation, but the exact phosphorylation sites important for the process remain elusive, as well as the mechanisms by which tau eventually causes cytotoxicity and cell death.

Few studies have used yeast to study the biology of tau, but the results of those that do indicate that yeast can serve as a reliable model, as key aspects of tau pathophysiology such as phosphorylation, conformational change and aggregation can be faithfully recapitulated [56]. When human 3R- and 4R-tau is expressed in *S. cerevisiae*, phosphorylation on pathologically relevant epitopes can be detected using phosphospecific antibodies, proving the existence of yeast kinases that are able to recognize and phosphorylate tau [57]. In addition, tau could also be detected using the conformation-dependent antibody MC-1, a marker for pathological tau filaments and their precursors [58-60]. In part, tau could be detected in the sarkosyl-insoluble fraction (SinT – sarkosyl-insoluble tau), indicating aggregated species [57]. Importantly, these characteristics were modulated by yeast kinases Mds1 and Pho85, respectively the orthologues of human kinases GSK-3 β and cdk5, these are the two best characterized in vivo tau kinases. Both are able to phosphorylate tau directly, and evidence suggests that cdk5 is also able to affect tau phosphorylation indirectly, by an

inhibition of GSK-3 β [61]. When Mds1 was deleted in *S. cerevisiae*, phosphorylation on the AD2 (P-S396-P-S404) and PG-5 (P-S409) isotope was decreased significantly. This was expected for the AD2 isotope, as this is a direct target of GSK-3 β in mammals [62]. PG-5 however is not a typical target of GSK-3 β , but of PK-A, which might indicate that Mds1 is able to affect phosphorylation on the PG-5 isotope indirectly [63, 64]. Interestingly, deleting Pho85 resulted in a significant increase of the immunoreactivity using these antibodies. This hyperphosphorylation was accompanied by an increase of MC-1 immunoreactivity and the presence of higher tau levels in the sarkosyl-insoluble fraction [57] (**Fig. 4B**). This observation links phosphorylation on these two epitopes to tau aggregation, and supports the idea that, like in mammals with cdk5 [65], Pho85 is able to affect tau phosphorylation indirectly, by acting as a negative regulator of phosphorylation, and thus conformational change and aggregation.

In vitro testing revealed further characteristics of hyperphosphorylated tau using two different techniques [57, 66]. Soluble tau isolated from WT, *mds1 Δ* and *pho85 Δ* retained its phosphorylation state, and it was shown that filament formation happen significantly faster with tau isolated from the *pho85 Δ* strain, consisted with its hyperphosphorylated state. Moreover, upon further fractionation, an MC-1 positive fraction could be obtained, and addition of these species to soluble tau vastly accelerated tau aggregation. This observation is consistent with a seeding capacity of hyperphosphorylated tau. In a second experiment, the in vitro binding capacity of yeast-isolated tau to microtubules was tested, using taxol-stabilized microtubules consisting of pig tubulin. An inverse correlation between phosphorylation state and the ability to bind and stabilize microtubules could be demonstrated, as tau isolated from the *pho85 Δ* strain showed the poorest MT binding. Tau from the wild type strain performed better in this assay, followed by *mds1 Δ* tau, which showed an impaired phosphorylation state. Binding of tau to yeast tubulin has not been shown, most likely due to differences between

yeast and mammalian tubulin.

Several clinical FTDP-17 (frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17) tau mutants were expressed in WT, *mds1Δ* and *pho85Δ* yeast strains, and their phosphorylation patterns and SinT levels were analyzed [67]. The effect of these mutations has been speculated to range from altering the ratio between 3R and 4R tau by influencing splicing efficiency, over affecting the microtubule binding capacities of tau, to changing the conformation of tau [54, 55, 68]. Interestingly, both P301L and R406W tau showed a decrease in phosphorylation at the PG5 epitope compared with the wild type tau, and SinT levels were reduced. These findings again suggested the importance of phosphorylation at this site in triggering tau phosphorylation. To confirm this, the PG5 epitope was mutated and the result of expression of the synthetic S409A- and pseudophosphorylated S409E-mutants was analyzed. The S409A mutant showed a reduction in aggregation, while the SinT levels of S409E tau were increased or comparable to the wild type. Phosphorylation of this epitope was also revealed to be detrimental for tau-microtubule interactions, revealing an antagonistic balance between propensity to aggregate and microtubule-binding. Interestingly, the S409A tau mutant showed a decrease in immunoreactivity at the AD2 epitope, pseudophosphorylated S409E tau conversely showed an increase of phosphorylation at this site. It appears that phosphorylation at S409 and S396/S404 is interdependent, and S409 phosphorylation might prime subsequent phosphorylation at the AD2 site.

As increasing evidence suggests that oxidative damage plays a role in the development of neurodegenerative disorders [69-72], the effect of oxidative stress and mitochondrial dysfunction on SinT formation of wild type and mutant tau was assessed [67]. Oxidative stress was applied by adding ferrous sulfate to the medium, which increases free radical formation. SinT levels in cells that had undergone this treatment were markedly increased, in particular for FTDP mutants, demonstrating that these mutants render tau more prone to

aggregation when subjected to oxidative stress. Interestingly, tau phosphorylation was decreased following ferrous sulfate treatment, especially at the AD2 and PG5 epitopes, suggesting that oxidative stress triggers an aggregation mechanism parallel to hyperphosphorylation (**Fig. 4B**). Moreover, oxidative stress treatment elevated SinT levels of S409A tau to levels comparable with wild type and S409E tau in untreated cells, again indicating that AD2 site phosphorylation is not a prerequisite for aggregate formation. As oxidative stress and mitochondrial dysfunction are closely linked, two deletion strains were analyzed as well, i.e. *sod2Δ*, lacking mitochondrial manganese-dependent superoxidase dismutase activity [73] and *rim1Δ*, which lacks a single-stranded DNA-binding protein essential for mitochondrial genome maintenance [74]. Similar to the results obtained in the oxidative stress experiments, SinT levels for tau 2N/4R were significantly elevated. The increase in SinT for S409A and S409E tau was in the same range, once again indicating that oxidative stress and hyperphosphorylation might be working synergistically on tau aggregation.

A note that has to be made is that although tau exhibits important features like hyperphosphorylation and aggregation in *S. cerevisiae*, no toxic effect was observed on exponentially growing cells, implying that aggregation is not necessarily linked to cytotoxicity. However, because experiments were performed on cells in the exponential growth phase, important factors like mitochondrial dynamics and oxidative stress were somewhat excluded. It is possible that tau does have a toxic effect in aging cell populations, affecting the longevity of the yeast culture.

Concluding remarks and future perspectives

The studies that have taken place in the recent past show off the potential that yeast have to

offer. Of course, some elements of neurodegeneration cannot be faithfully recaptured in unicellular eukaryote as simple as *S. cerevisiae*, with its absence of synapses and whatnot. However, the high level of homology with the human genome and the conservation of important basic pathways relevant to human disease make yeast a powerful model to consider, especially combined with the experimental advantages. Now robust and reliable models for A β and tau have been established, exciting developments regarding the underlying molecular mechanisms of cytotoxicity are closer than ever. The involvement of several genes have already been implicated today, results that could be confirmed in higher organisms, and we strongly believe that this inclusion of several model systems is the way forward. So to the naysayers, look again, because there is something more to this organism than baking bread and brewing beer.

References

1. Abbott, A., *Dementia: A problem for our age*. Nature, 2011. **475**(7555): p. S2-S4.
2. Goffeau, A., et al., *Life with 6000 genes*. Science, 1996. **274**(5287): p. 546, 563-7.
3. Suter, B., D. Auerbach, and I. Stagljar, *Yeast-based functional genomics and proteomics technologies: the first 15 years and beyond*. BioTechniques, 2006. **40**(5): p. 625-44.
4. Christie, K.R., E.L. Hong, and J.M. Cherry, *Functional annotations for the Saccharomyces cerevisiae genome: the knowns and the known unknowns*. Trends in microbiology, 2009. **17**(7): p. 286-94.
5. Botstein, D., S.A. Chervitz, and J.M. Cherry, *Yeast as a model organism*. Science, 1997. **277**(5330): p. 1259-60.
6. Foury, F., *Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast*. Gene, 1997. **195**(1): p. 1-10.
7. Sherman, F., *Getting started with yeast*. Methods in enzymology, 2002. **350**: p. 3-41.
8. Winzeler, E.A., et al., *Functional characterization of the S. cerevisiae genome by gene deletion and parallel analysis*. Science, 1999. **285**(5429): p. 901-6.
9. Hu, Y., et al., *Approaching a complete repository of sequence-verified protein-encoding clones for Saccharomyces cerevisiae*. Genome research, 2007. **17**(4): p. 536-43.
10. Jones, G.M., et al., *A systematic library for comprehensive overexpression screens in Saccharomyces cerevisiae*. Nature methods, 2008. **5**(3): p. 239-41.
11. DeRisi, J.L., V.R. Iyer, and P.O. Brown, *Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale*. Science, 1997. **278**(5338): p. 680-6.
12. Hoon, S., et al., *Yeast chemical genomics and drug discovery: an update*. Trends in pharmacological sciences, 2008. **29**(10): p. 499-504.
13. Parsons, A.B., et al., *Exploring the mode-of-action of bioactive compounds by chemical-genetic profiling in yeast*. Cell, 2006. **126**(3): p. 611-25.

14. Mager, W.H. and J. Winderickx, *Yeast as a model for medical and medicinal research*. Trends in pharmacological sciences, 2005. **26**(5): p. 265-73.
15. Khurana, V. and S. Lindquist, *Modelling neurodegeneration in Saccharomyces cerevisiae: why cook with baker's yeast?* Nature reviews. Neuroscience, 2010. **11**(6): p. 436-49.
16. Winderickx, J., et al., *Protein folding diseases and neurodegeneration: lessons learned from yeast*. Biochimica et biophysica acta, 2008. **1783**(7): p. 1381-95.
17. Esler, W.P. and M.S. Wolfe, *A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces*. Science, 2001. **293**(5534): p. 1449-54.
18. De Strooper, B. and W. Annaert, *Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein*. Journal of cell science, 2000. **113** (Pt 11): p. 1857-70.
19. Duce, J.A., et al., *Iron-export ferroxidase activity of beta-amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease*. Cell, 2010. **142**(6): p. 857-67.
20. Kopan, R. and M.X. Ilagan, *Gamma-secretase: proteasome of the membrane?* Nature reviews. Molecular cell biology, 2004. **5**(6): p. 499-504.
21. Steiner, H., R. Fluhner, and C. Haass, *Intramembrane proteolysis by gamma-secretase*. The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(44): p. 29627-31.
22. Turner, P.R., et al., *Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory*. Progress in neurobiology, 2003. **70**(1): p. 1-32.
23. Ertekin-Taner, N., *Genetics of Alzheimer's disease: a centennial review*. Neurologic clinics, 2007. **25**(3): p. 611-67, v.
24. LaFerla, F.M., K.N. Green, and S. Oddo, *Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease*. Nature reviews. Neuroscience, 2007. **8**(7): p. 499-509.
25. Suzuki, T., et al., *Trafficking of Alzheimer's disease-related membrane proteins and its participation in disease pathogenesis*. Journal of biochemistry, 2006. **139**(6): p. 949-55.
26. Vetrivel, K.S. and G. Thinakaran, *Amyloidogenic processing of beta-amyloid precursor protein in intracellular compartments*. Neurology, 2006. **66**(2 Suppl 1): p. S69-73.
27. Almeida, C.G., R.H. Takahashi, and G.K. Gouras, *Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2006. **26**(16): p. 4277-88.
28. Chen, X. and S.D. Yan, *Mitochondrial Abeta: a potential cause of metabolic dysfunction in Alzheimer's disease*. IUBMB life, 2006. **58**(12): p. 686-94.
29. Reddy, P.H., *Amyloid precursor protein-mediated free radicals and oxidative damage: implications for the development and progression of Alzheimer's disease*. Journal of neurochemistry, 2006. **96**(1): p. 1-13.
30. Keating, D.J., C. Chen, and M.A. Pritchard, *Alzheimer's disease and endocytic dysfunction: clues from the Down syndrome-related proteins, DSCR1 and ITSN1*. Ageing research reviews, 2006. **5**(4): p. 388-401.
31. Scragg, J.L., et al., *Alzheimer's amyloid peptides mediate hypoxic up-regulation of L-type Ca²⁺ channels*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2005. **19**(1): p. 150-2.
32. Andersen, O.M., et al., *Molecular dissection of the interaction between amyloid precursor protein and its neuronal trafficking receptor SorLA/LR11*. Biochemistry, 2006. **45**(8): p. 2618-28.
33. Zhang, H., et al., *Proteolytic processing and secretion of human beta-amyloid precursor protein in yeast. Evidence for a yeast secretase activity*. The Journal of biological chemistry, 1994. **269**(45): p. 27799-802.
34. Zhang, W., et al., *Characterization of beta-amyloid peptide precursor processing by the yeast Yap3 and Mkc7 proteases*. Biochimica et biophysica acta, 1997. **1359**(2): p. 110-22.
35. Luthi, U., et al., *Human beta-secretase activity in yeast detected by a novel cellular growth selection system*. Biochimica et biophysica acta, 2003. **1620**(1-3): p. 167-78.
36. Edbauer, D., et al., *Reconstitution of gamma-secretase activity*. Nature cell biology, 2003.

- 5(5): p. 486-8.
37. Sparvero, L.J., et al., *Proteomic analysis of the amyloid precursor protein fragment C99: expression in yeast*. Analytical biochemistry, 2007. **370**(2): p. 162-70.
 38. Treusch, S., et al., *Functional links between Abeta toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast*. Science, 2011. **334**(6060): p. 1241-5.
 39. Harold, D., et al., *Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease*. Nature genetics, 2009. **41**(10): p. 1088-93.
 40. Lambert, J.C., et al., *Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease*. Nature genetics, 2009. **41**(10): p. 1094-9.
 41. D'Angelo, F., et al., *A yeast model for amyloid-beta aggregation exemplifies the role of membrane trafficking and PICALM in cytotoxicity*. Disease models & mechanisms, 2013. **6**(1): p. 206-16.
 42. Meriin, A.B., et al., *Huntington toxicity in yeast model depends on polyglutamine aggregation mediated by a prion-like protein Rnq1*. The Journal of cell biology, 2002. **157**(6): p. 997-1004.
 43. Bagriantsev, S. and S. Liebman, *Modulation of Abeta42 low-n oligomerization using a novel yeast reporter system*. BMC biology, 2006. **4**: p. 32.
 44. Park, S.K., et al., *Development and validation of a yeast high-throughput screen for inhibitors of Abeta(4)(2) oligomerization*. Disease models & mechanisms, 2011. **4**(6): p. 822-31.
 45. Buee, L., et al., *Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders*. Brain research. Brain research reviews, 2000. **33**(1): p. 95-130.
 46. Maas, T., J. Eidenmuller, and R. Brandt, *Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(21): p. 15733-40.
 47. Brandt, R., J. Leger, and G. Lee, *Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain*. The Journal of cell biology, 1995. **131**(5): p. 1327-40.
 48. Fulga, T.A., et al., *Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo*. Nature cell biology, 2007. **9**(2): p. 139-48.
 49. Scales, T.M., et al., *Tyrosine phosphorylation of tau by the SRC family kinases lck and fyn*. Molecular neurodegeneration, 2011. **6**: p. 12.
 50. Lee, G., *Tau and src family tyrosine kinases*. Biochimica et biophysica acta, 2005. **1739**(2-3): p. 323-30.
 51. Ittner, L.M. and J. Gotz, *Amyloid-beta and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease*. Nature reviews. Neuroscience, 2011. **12**(2): p. 65-72.
 52. Sergeant, N., et al., *Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders*. Expert review of proteomics, 2008. **5**(2): p. 207-24.
 53. Gendron, T.F. and L. Petrucelli, *The role of tau in neurodegeneration*. Molecular neurodegeneration, 2009. **4**: p. 13.
 54. Lee, V.M., M. Goedert, and J.Q. Trojanowski, *Neurodegenerative tauopathies*. Annual review of neuroscience, 2001. **24**: p. 1121-59.
 55. Sergeant, N., A. Delacourte, and L. Buee, *Tau protein as a differential biomarker of tauopathies*. Biochimica et biophysica acta, 2005. **1739**(2-3): p. 179-97.
 56. De Vos, A., et al., *Yeast as a model system to study tau biology*. International journal of Alzheimer's disease, 2011. **2011**: p. 428970.
 57. Vandebroek, T., et al., *Identification and isolation of a hyperphosphorylated, conformationally changed intermediate of human protein tau expressed in yeast*. Biochemistry, 2005. **44**(34): p. 11466-75.
 58. Carmel, G., et al., *The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology*. The Journal of biological chemistry, 1996. **271**(51): p. 32789-95.

59. Uboga, N.V. and J.L. Price, *Formation of diffuse and fibrillar tangles in aging and early Alzheimer's disease*. Neurobiology of aging, 2000. **21**(1): p. 1-10.
60. Weaver, C.L., et al., *Conformational change as one of the earliest alterations of tau in Alzheimer's disease*. Neurobiology of aging, 2000. **21**(5): p. 719-27.
61. Hallows, J.L., et al., *Decreased cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) activity is accompanied by redistribution of cdk5 and cytoskeletal proteins and increased cytoskeletal protein phosphorylation in p35 null mice*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2003. **23**(33): p. 10633-44.
62. Spittaels, K., et al., *Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein*. The American journal of pathology, 1999. **155**(6): p. 2153-65.
63. Jicha, G.A., et al., *cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 1999. **19**(17): p. 7486-94.
64. Zheng-Fischhofer, Q., et al., *Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation*. European journal of biochemistry / FEBS, 1998. **252**(3): p. 542-52.
65. Wen, Y., et al., *Interplay between cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 beta mediated by neuregulin signaling leads to differential effects on tau phosphorylation and amyloid precursor protein processing*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2008. **28**(10): p. 2624-32.
66. Vandebroek, T., et al., *Microtubule binding and clustering of human Tau-4R and Tau-P301L proteins isolated from yeast deficient in orthologues of glycogen synthase kinase-3beta or cdk5*. The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(35): p. 25388-97.
67. Vanhelmont, T., et al., *Serine-409 phosphorylation and oxidative damage define aggregation of human protein tau in yeast*. FEMS yeast research, 2010. **10**(8): p. 992-1005.
68. Gamblin, T.C., R.W. Berry, and L.I. Binder, *Tau polymerization: role of the amino terminus*. Biochemistry, 2003. **42**(7): p. 2252-7.
69. Bobba, A., et al., *Alzheimer's proteins, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction interplay in a neuronal model of Alzheimer's disease*. International journal of Alzheimer's disease, 2010. **2010**.
70. Martinez, A., et al., *Protein targets of oxidative damage in human neurodegenerative diseases with abnormal protein aggregates*. Brain pathology, 2010. **20**(2): p. 281-97.
71. Melov, S., et al., *Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau*. PloS one, 2007. **2**(6): p. e536.
72. Moreira, P.I., et al., *Alzheimer disease and the role of free radicals in the pathogenesis of the disease*. CNS & neurological disorders drug targets, 2008. **7**(1): p. 3-10.
73. van Loon, A.P., B. Pesold-Hurt, and G. Schatz, *A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986. **83**(11): p. 3820-4.
74. Van Dyck, E., et al., *A single-stranded DNA binding protein required for mitochondrial DNA replication in S. cerevisiae is homologous to E. coli SSB*. The EMBO journal, 1992. **11**(9): p. 3421-30.

Acknowledgments

Figures

Fig.1: High-throughput experiments can easily be performed in *Saccharomyces cerevisiae*. **A)** A yeast strain expressing an inducible toxic A β construct is transformed by a library of 5532 ORFs. After replica-plating from non-inducing to inducing conditions, plasmids from transformants displaying additional toxicity or an increase in growth can be isolated and sequenced, in order to identify the responsible ORF. **B)** In order to further analyse the effect of deletion or overexpression of selected genes, the A β construct can be transformed into the proper deletion or overexpression strains, after which the necessary experiments can be performed.

Fig.2: The amyloid precursor protein APP is targeted to the plasma membrane, where it can be cleaved, in the non-amyloidogenic pathway, by α -secretase, leading to the production of a soluble fragment sAPP α , which is released into the extracellular space. The C-terminal part of 83 amino acids length (C83) remains embedded in membrane and can subsequently be cleaved by γ -secretase, releasing the p3 fragment. In the amyloidogenic pathway, β -secretase cleavage produces a 99 amino acids fragment (C99) retained within the membrane. C99 is cleaved by γ -secretase present in the plasma membrane, but also in the ER, resulting in release of the A β peptide.

Fig.3: In neurons, the A β peptide is not only produced at the plasma membrane, but may also be generated in intracellular compartments such as the endoplasmic reticulum and the trans-Golgi.(A) Also, extracellularly released peptides can be re-endocytosed. These different mechanisms allow to detect A β in multivesicular bodies (MVB), lysosomes, ER and Golgi, but also in mitochondria and the cytosol. APP processing, A β toxicity and aggregation were modeled in *S. cerevisiae*. APP (B), the C99 fragment (C), A β alone (D) or fused to GFP (F) were targeted to the secretory pathway by the addition of the secretion signal of alpha factor

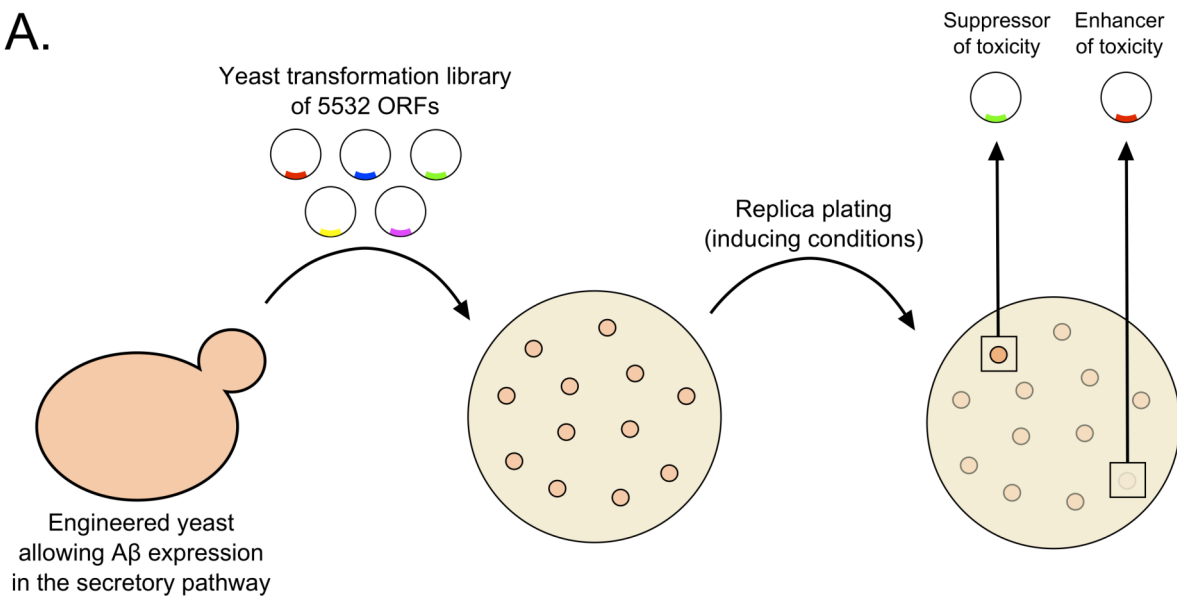
(B, C and F) or Kar2 (D). These models allowed Zhang *et al.* to identify “secretase-like” activities in yeast (B, Yap3 and Mkc7), whereas Sparvero *et al.* put in light the essential role of the proteasome in the removal of aggregation prone species after expression of C99. (C) The toxicity models of Treusch *et al.* (D) and D’Angelo *et al.* (F) have highlighted the involvement of clathrin-dependent endocytosis (via Yap1802, Yap1801, red star) in A β toxicity, but also demonstrated a rapid alteration of cellular respiration following A β expression in the secretory pathway. Cytoplasmic models of A β aggregation using A β fused to GFP (E) or to the C-terminal part of Sup35 (lacking prion domain) (G), helped to underline the role of Hsp104 in A β aggregation and led to an efficient oligomerization assay.

Fig.4: **A)** In healthy neurons, Tau binds to and stabilizes microtubules. This binding can be regulated by differential levels of Tau phosphorylation, creating a very dynamic scenario where the cell can easily alter the stability of microtubules, important for efficient transmission of signals. In neurons affected by AD however, Tau is hyperphosphorylated due to an altered activity of diverse kinases and phosphatases, impairing its ability to bind microtubules. Hyperphosphorylation of tau changes its conformation and causes tau to oligomerize and eventually to aggregate into paired helical fragments (PHFs) and neurofibrillary tangles (NFTs). The microtubules on the other hand are destabilized and will begin to depolymerize, leading to a disruption of the cytoskeleton and severe problems in signal transmission. **B)** In *Saccharomyces cerevisiae*, the Tau protein can be expressed after transformation with a vector containing a Tau construct. In a wild type strain, a fraction of Tau is phosphorylated on relevant pathological epitopes, as determined by immunodetection with phosphospecific antibodies. SinT assays also determined that a minor fraction of Tau is insoluble in sarkosyl, a measurement for aggregated species. In *mds1 Δ* and *pho85 Δ* deletion strains, respectively the orthologues of human kinases GSK-3 β and cdk5, these characteristics

were affected, with less phosphorylation and aggregated species in *mds1Δ* and a significant increase in phosphorylation and aggregation levels in *pho85Δ*. Interestingly, when applying oxidative stress, phosphorylation levels were slightly lower than compared to the wild type, while aggregation was increased, suggesting a second, alternative pathway leading to Tau aggregation.

Figure 1

A.



B

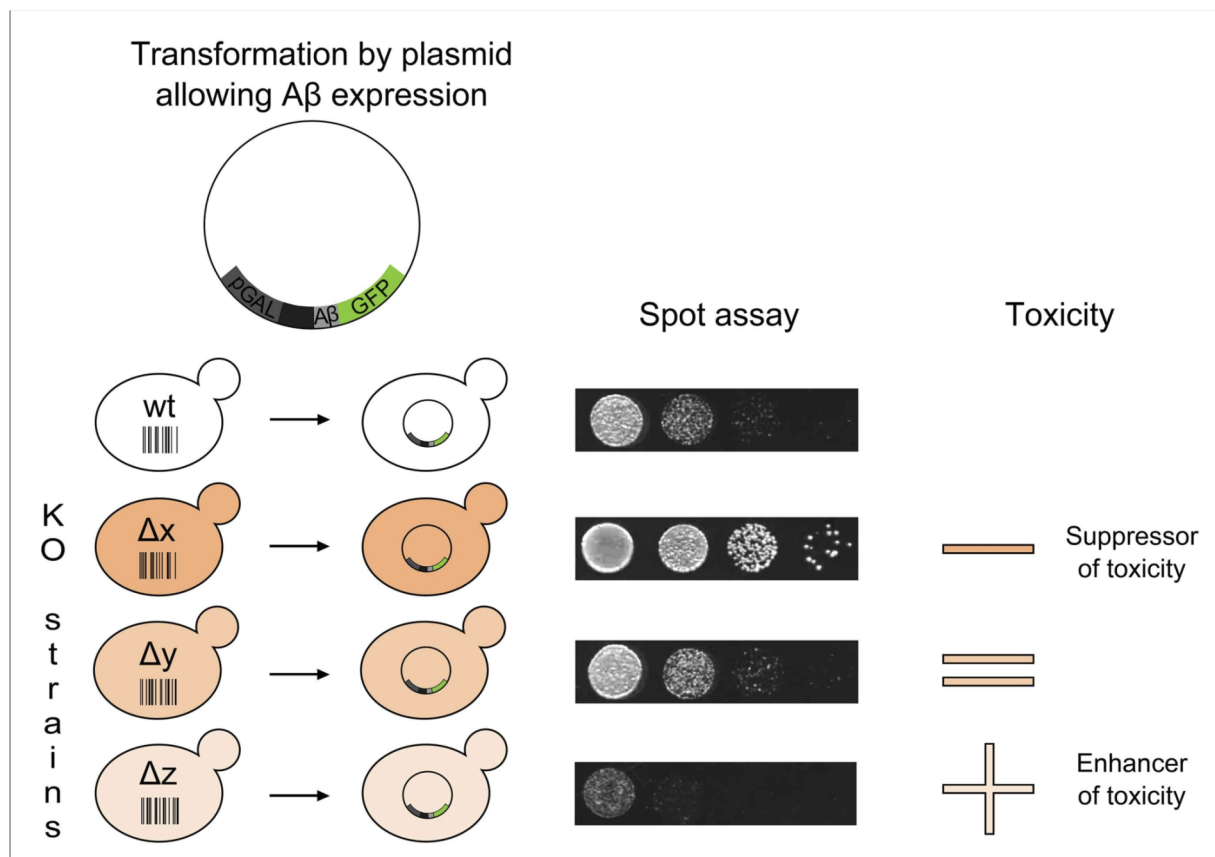


Figure 2

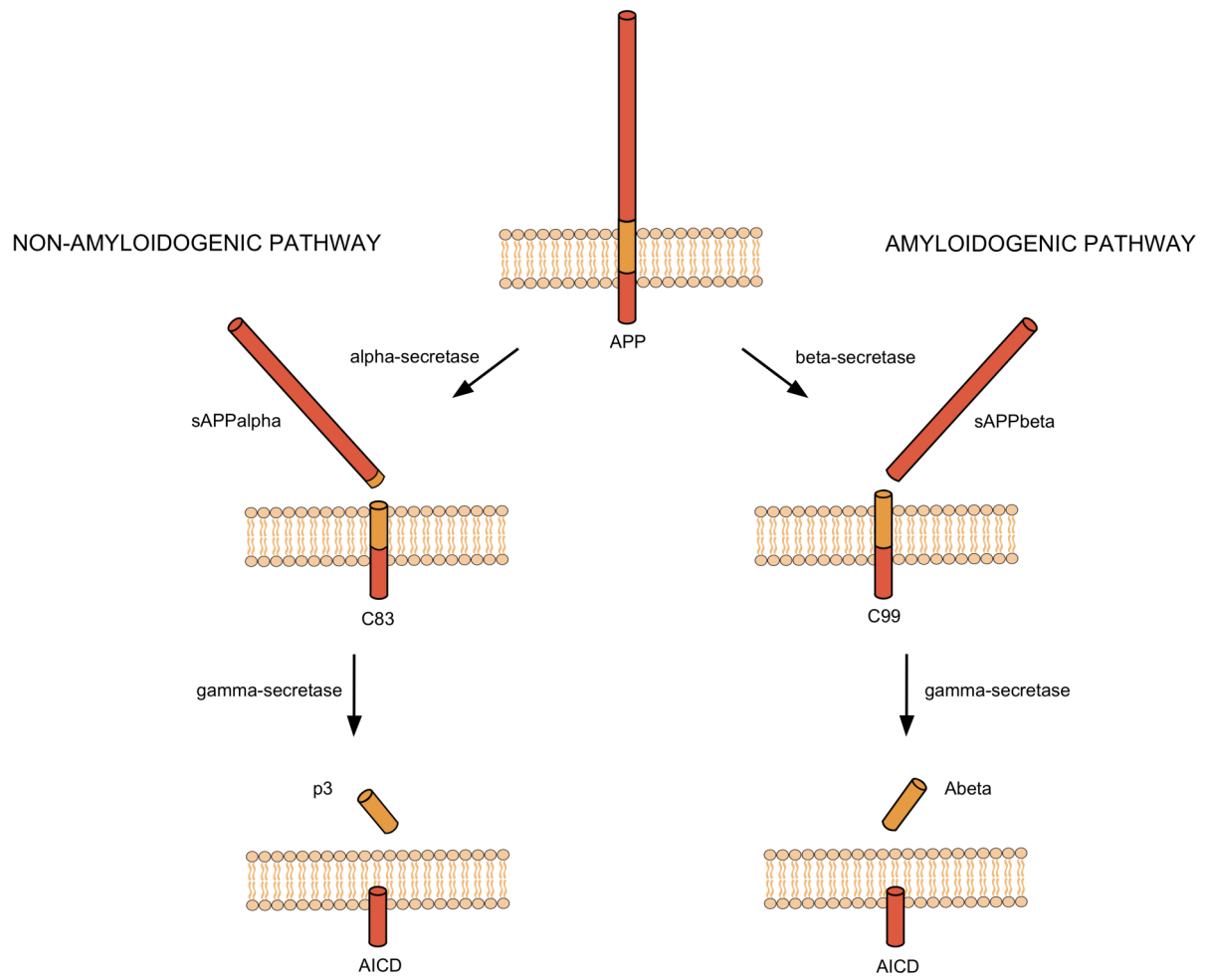


Figure 3

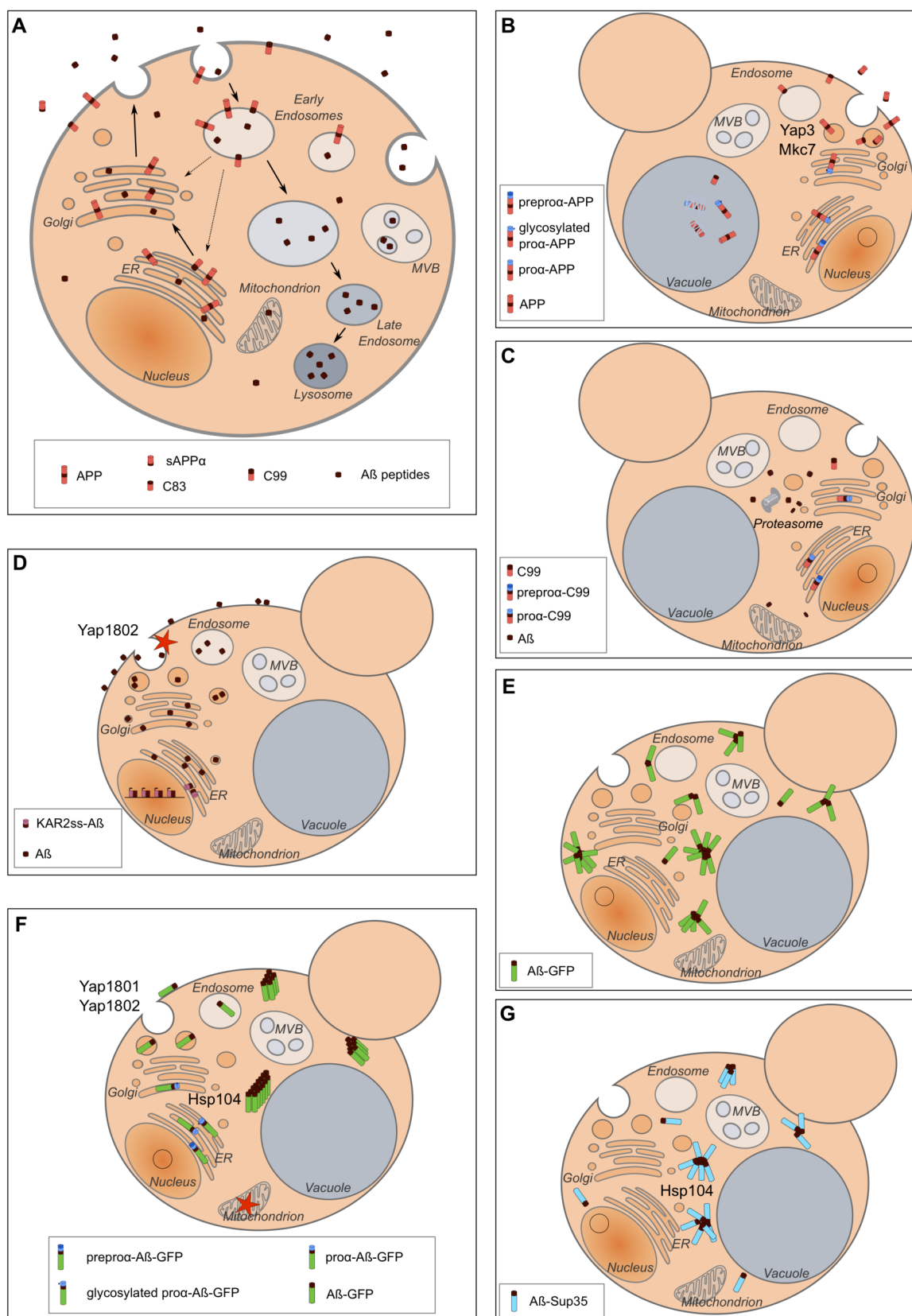
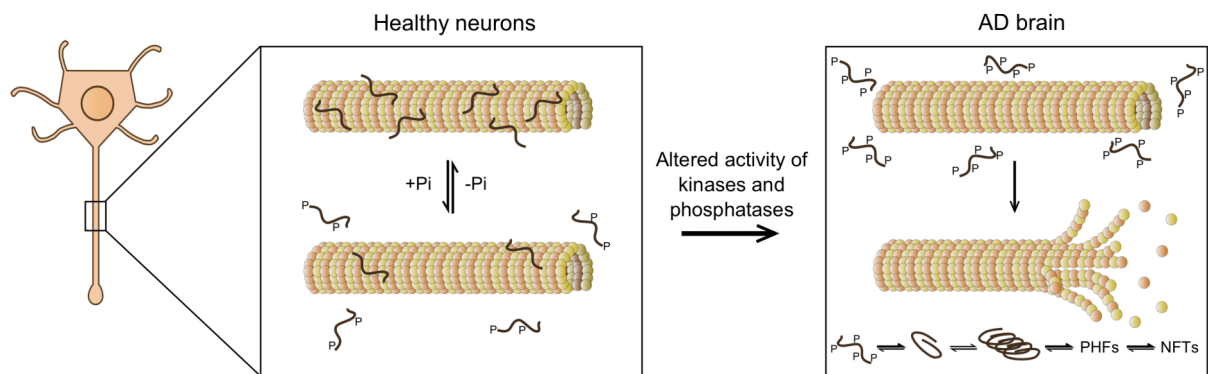
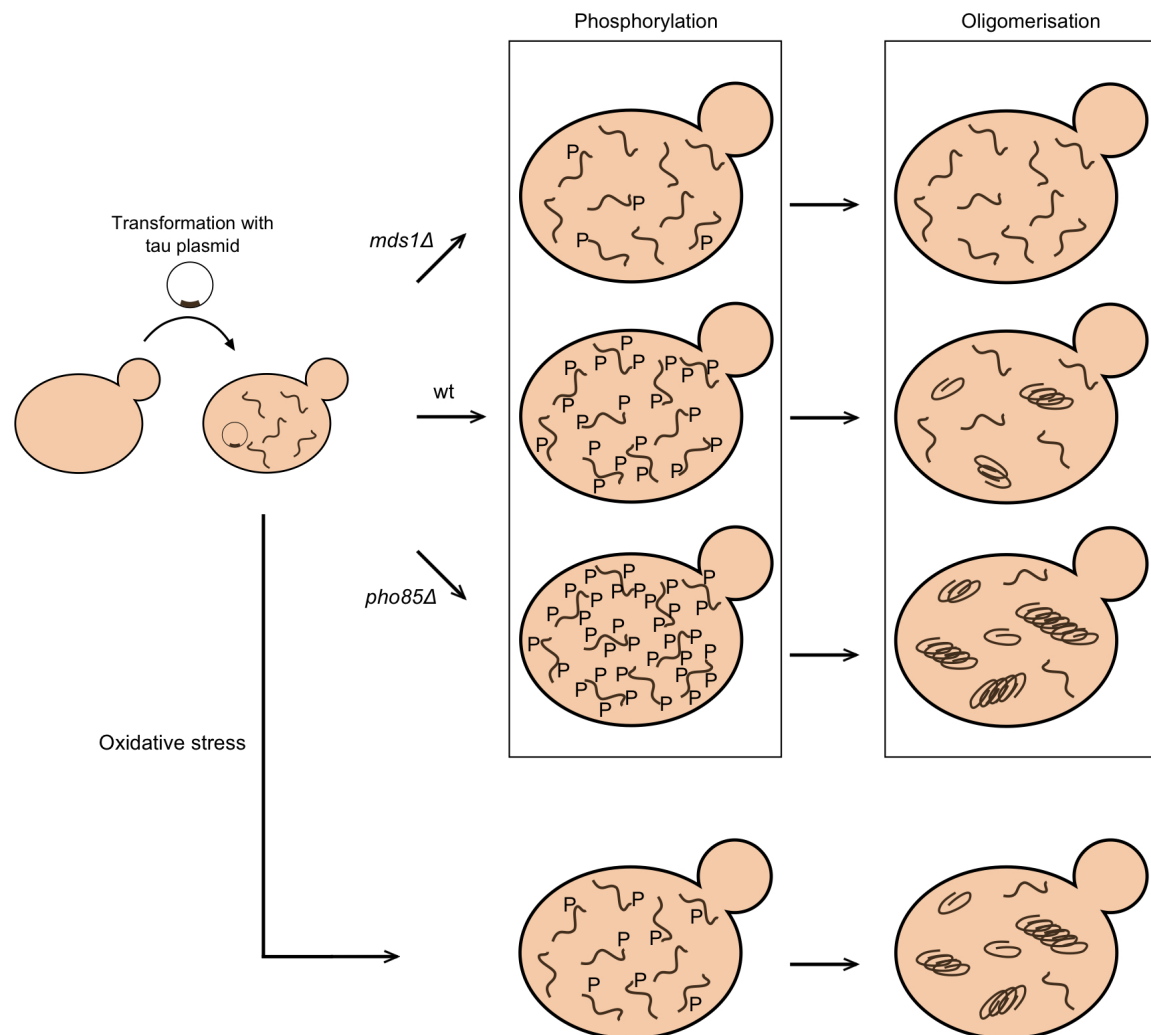


Figure 4

A



B



BIBLIOGRAPHIE

- Aguzzi, A., Heikenwalder, M., and Polymenidou, M. (2007). Insights into prion strains and neurotoxicity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 552-561.
- Ahmad, S., Sikorska, B., Knight, R., Ironside, J., and Liberski, P. (2012). Creutzfeldt-Jakob Disease. In *Neurodegenerative Diseases* (Springer US).
- Alberdi, E., Sánchez-Gómez, M.V., Cavaliere, F., Pérez-Samartín, A., Zugaza, J.L., Trullas, R., Domercq, M., and Matute, C. (2010). Amyloid beta oligomers induce Ca²⁺ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium* 47, 264-272.
- Alliegro, M.C. (2000). Effects of dithiothreitol on protein activity unrelated to thiol-disulfide exchange: for consideration in the analysis of protein function with Cleland's reagent. *Anal Biochem* 282, 102-06.
- Alonso, A., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2001). Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6923-28.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und phychish- Gerichtliche Medizin* 64, 146-48.
- Alzheimer, A., Stelzmann, R.A., Schnitzlein, H.N., and Murtagh, F.R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". *Clin Anat* 8, 429-431.
- Arduengo, P.M., Appleberry, O.K., Chuang, P., and L'Hernault, S.W. (1998). The presenilin protein family member SPE-4 localizes to an ER/Golgi derived organelle and is required for proper cytoplasmic partitioning during *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis. *J Cell Sci* 111 (Pt 24), 3645-654.
- Arispe, N., Pollard, H.B., and Rojas, E. (1993). Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10573-77.
- Arispe, N., Rojas, E., and Pollard, H.B. (1993). Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 567-571.
- Asl, L.H., Fournier, V., Billerey, C., Justrabo, E., Chevet, D., Droz, D., Pécheux, C., Delpech, M., and Grateau, G. (1998). Fibrinogen Alpha chain mutation (Arg554 Leu) associated with hereditary renal amyloidosis in a French family. *Amyloid* 5, 279-284.
- Bagriantsev, S., and Liebman, S. (2006). Modulation of Abeta42 low-n oligomerization using a novel yeast reporter system. *BMC Biol* 4, 32.
- Barghorn, S., Nimmrich, V., Striebinger, A., Krantz, C., Keller, P., Janson, B., Bahr, M., Schmidt, M., Bitner, R.S., et al. (2005). Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 95, 834-847.

- Baryshnikova, A., Costanzo, M., Dixon, S., Vizeacoumar, F.J., Myers, C.L., Andrews, B., and Boone, C. (2010). Synthetic genetic array (SGA) analysis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* 470, 145-179.
- Beckett, C., Nalivaeva, N.N., Belyaev, N.D., and Turner, A.J. (2012). Nuclear signalling by membrane protein intracellular domains: the AICD enigma. *Cell Signal* 24, 402-09.
- Bekris, L.M., Yu, C.E., Bird, T.D., and Tsuang, D.W. (2010). Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23, 213-227.
- Benditt, E.P., and Eriksen, N. (1971). Chemical Classes of Amyloid Substance. *Am. J Pathol.* 65, 231-250.
- Berson, J.F., Theos, A.C., Harper, D.C., Tenza, D., Raposo, G., and Marks, M.S. (2003). Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. *J Cell Biol* 161, 521-533.
- Berthelot, K., Ta, H.P., Géan, J., Lecomte, S., and Cullin, C. (2011). In vivo and in vitro analyses of toxic mutants of HET-s: FTIR antiparallel signature correlates with amyloid toxicity. *J Mol Biol* 412, 137-152.
- Bertram, L., and Tanzi, R.E. (2009). Genome-wide association studies in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 18, R137-145.
- Bertram, L., Lill, C.M., and Tanzi, R.E. (2010). The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron* 68, 270-281.
- Bessen, R.A., and Marsh, R.F. (1994). Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* 68, 7859-868.
- Bieler, S., Estrada, L., Lagos, R., Baeza, M., Castilla, J., and Soto, C. (2005). Amyloid formation modulates the biological activity of a bacterial protein. *J Biol Chem* 280, 26880-85.
- Billings, L.M., Oddo, S., Green, K.N., McGaugh, J.L., and LaFerla, F.M. (2005). Intraneuronal Aβ causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45, 675-688.
- Binder, L.I., Frankfurter, A., and Rebhun, L.I. (1985). The distribution of Tau in the mammalian central nervous system. *Journal of Cell Biology* 101.
- Blanc, E.M., Toborek, M., Mark, R.J., Hennig, B., and Mattson, M.P. (1997). Amyloid beta-peptide induces cell monolayer albumin permeability, impairs glucose transport, and induces apoptosis in vascular endothelial cells. *J Neurochem* 68, 1870-881.
- Brachmann, A., Baxa, U., and Wickner, R.B. (2005). Prion generation in vitro: amyloid of Ure2p is infectious. *EMBO J* 24, 3082-092.
- Bramblett, G.T., Goedert, M., Jakes, R., Merrick, S.E., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1993). Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* 10, 1089-099.
- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C.M., and Stefani, M. (2002). Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* 416, 507-511.
- Bursch, W. (2001). The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* 8, 569-581.

- Busciglio, J., Lorenzo, A., Yeh, J., and Yankner, B.A. (1995). beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14, 879-888.
- Buxbaum, J.D., Liu, K.N., Luo, Y., Slack, J.L., Stocking, K.L., Peschon, J.J., Johnson, R.S., Castner, B.J., Cerretti, D.P., and Black, R.A. (1998). Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273, 27765-67.
- Caillé, I., Allinquant, B., Dupont, E., Bouillot, C., Langer, A., Müller, U., and Prochiantz, A. (2004). Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development* 131, 2173-181.
- Caine, J., Sankovich, S., Antony, H., Waddington, L., Macreadie, P., Varghese, J., and Macreadie, I. (2007). Alzheimer's Aβeta fused to green fluorescent protein induces growth stress and a heat shock response. *FEMS Yeast Res* 7, 1230-36.
- Calkins, M.J., Manczak, M., Mao, P., Shirendeb, U., and Reddy, P.H. (2011). Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 20, 4515-529.
- Calzolari, L., Lysek, D.A., Pérez, D.R., Güntert, P., and Wüthrich, K. (2005). Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 651-55.
- Cao, X., and Südhof, T.C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115-120.
- Carmine-Simmen, K., Proctor, T., Tschäpe, J., Poeck, B., Triphan, T., Strauss, R., and Kretschmar, D. (2009). Neurotoxic effects induced by the *Drosophila* amyloid-β peptide suggest a conserved toxic function. *Neurobiol Dis* 33, 274-281.
- Castano, E.M., Prelli, F., Wisniewski, T., Golabek, A., Kumar, R.A., Soto, C., and Frangione, B. (1995). Fibrillogenesis in Alzheimer's disease of amyloid beta peptides and apolipoprotein E. *Biochem J* 306, 599-90.
- Castellani, R.J., Rolston, R.K., and Smith, M.A. (2010). Alzheimer disease. *Dis Mon* 56, 484-546.
- Castellano, J.M., Kim, J., Stewart, F.R., Jiang, H., DeMattos, R.B., Patterson, B.W., Fagan, A.M., Morris, J.C., Mawuenyega, K.G., et al. (2011). Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-β peptide clearance. *Sci Transl Med* 3, 89ra57.
- Cerf, E., Sarroukh, R., Tamamizu-Kato, S., Breydo, L., Derclaye, S., Dufrêne, Y.F., Narayanaswami, V., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.M., and Raussens, V. (2009). Antiparallel beta-sheet: a signature structure of the oligomeric amyloid beta-peptide. *Biochem J* 421, 415-423.
- Chapman, M.R., Robinson, L.S., Pinkner, J.S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S., and Hultgren, S.J. (2002). Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* 295, 851-55.
- Chen A. C. & Selkoe D. J. (2007). Neuron. In *Response to: Pardossi-Piquard et al., "Presenilin-Dependent Transcriptional Control of the Aβeta-Degrading Enzyme Neprilysin by Intracellular Domains of betaAPP and APLP."* *Neuron* 46, 541-554.. United States: [UNKNOWN REFERENCE TYPE]

- Chernoff, Y.O., Newnam, G.P., Kumar, J., Allen, K., and Zink, A.D. (1999). Evidence for a Protein Mutator in Yeast: Role of the Hsp70-Related Chaperone Ssb in Formation, Stability, and Toxicity of the [PSI] Prion. *Mol Cell Biol* 19, 8103-112.
- Claessen, D., Rink, R., de Jong, W., Siebring, J., de Vreugd, P., Boersma, F.G., Dijkhuizen, L., and Wosten, H.A. (2003). A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes Dev* 17, 1714-726.
- Clark, A., Lewis, C.E., Willis, A.C., Cooper, G.J.S., Morris, J.F., Reid, K.B.M., and Turner, R.C. (1987). ISLET AMYLOID FORMED FROM DIABETES-ASSOCIATED PEPTIDE MAY BE PATHOGENIC IN TYPE-2 DIABETES. *The Lancet* 330, 231-34.
- Cleveland, D.W., Hwo, S.-Y., and Kirschner, M.W. (1977). Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* 116, 207-225.
- Cohen, A.S., and Calkins, E. (1959). Electron Microscopic Observations on a Fibrous Component in Amyloid of Diverse Origins. *Nature* 183, 1202-03.
- Cohen, A.S., and Calkins, E. (1964). THE ISOLATION OF AMYLOID FIBRILS AND A STUDY OF THE EFFECT OF COLLAGENASE AND HYALURONIDASE. *J Cell Biol* 21, 481-86.
- Cohen, R.M., Rezai-Zadeh, K., Weitz, T.M., Rentsendorj, A., Gate, D., Spivak, I., Bholat, Y., Vasilevko, V., Glabe, C.G., et al. (2013). A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric $\alpha\beta$, and frank neuronal loss. *J Neurosci* 33, 6245-256.
- Collinge, J. (2005). Molecular neurology of prion disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76, 906-919.
- Collinge, J., Sidle, K.C.L., Meads, J., Ironside, J., and Hill, A.F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383, 685-690.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., and Pericak-Vance, M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921-23.
- Courchesne, W.E., and Magasanik, B. (1988). Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of the URE2 and GLN3 genes. *J Bacteriol* 170, 708-713.
- Coustou, V., Deleu, C., Saupe, S., and Begueret, J. (1997). The protein product of the het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9773-78.
- Cox, B.S. (1965). Ψ , a cytoplasmic suppressor of super-suppressor in yeast. *Heredity* 20, 505-521.
- Crowther, D.C., Kinghorn, K.J., Miranda, E., Page, R., Curry, J.A., Duthie, F.A., Gubb, D.C., and Lomas, D.A. (2005). Intraneuronal A β , non-amyloid aggregates and neurodegeneration in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 132, 123-135.
- Cupers, P., Orlans, I., Craessaerts, K., Annaert, W., and De Strooper, B. (2001). The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by γ -secretase is rapidly

- degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture. *J Neurochem* 78, 1168-178.
- Dahlgren, K.N., Manelli, A.M., Stine, W.B., Baker, L.K., Krafft, G.A., and LaDu, M.J. (2002). Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem* 277, 32046-053.
- Daigle, I., and Li, C. (1993). *apl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 12045-49.
- Danzer, K.M., Haasen, D., Karow, A.R., Moussaud, S., Habeck, M., Giese, A., Kretschmar, H., Hengeler, B., and Kostka, M. (2007). Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J Neurosci* 27, 9220-232.
- Debets, A.J., Dalstra, H.J., Slakhorst, M., Koopmanschap, B., Hoekstra, R.F., and Saupe, S.J. (2012). High natural prevalence of a fungal prion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 10432-37.
- Delacourte, A., David, J.P., Sergeant, N., Buée, L., Wattez, A., Vermersch, P., Ghazali, F., Fallet-Bianco, C., Pasquier, F., et al. (1999). The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 52, 1158-165.
- Demuro, A., Mina, E., Kaye, R., Milton, S.C., Parker, I., and Glabe, C.G. (2005). Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem* 280, 17294-7300.
- Devi, L., Prabhu, B.M., Galati, D.F., Avadhani, N.G., and Anandatheerthavarada, H.K. (2006). Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 26, 9057-068.
- Di Berardo, C., Capstick, D.S., Bibb, M.J., Findlay, K.C., Buttner, M.J., and Elliot, M.A. (2008). Function and redundancy of the chaplin cell surface proteins in aerial hypha formation, rodlet assembly, and viability in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 190, 5879-889.
- Dickson, D.W. (2012). Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P., and Aronin, N. (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277, 1990-93.
- Dittmar, J.C., Reid, R.J., and Rothstein, R. (2010). ScreenMill: a freely available software suite for growth measurement, analysis and visualization of high-throughput screen data. *BMC Bioinformatics* 11, 353.
- Drake, J., Link, C.D., and Butterfield, D.A. (2003). Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid β -peptide (1-42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model. *Neurobiol Aging* 24, 415-420.
- Drechsel, D.N., Hyman, A.A., Cobb, M.H., and Kirschner, M.W. (1992). Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell* 3, 1141-154.
- Du, H., Guo, L., Fang, F., Chen, D., Sosunov, A.A., McKhann, G.M., Yan, Y., Wang, C., Zhang, H., et al. (2008). Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal

- perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nat Med* *14*, 1097-1105.
- Duffy, P., Wolf, J., Collins, G., DeVoe, A.G., Streeten, B., and Cowen, D. (1974). Possible Person-to-Person Transmission of Creutzfeldt-Jakob Disease. *N Engl J Med* *290*, 692-93.
- Duyao, M.P., Auerbach, A.B., Ryan, A., Persichetti, F., Barnes, G.T., McNeil, S.M., Ge, P., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., and Joyner, A.L. (1995). Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* *269*, 407-410.
- Eanes, E.D., and Glenner, G.G. (1968). X-Ray Diffraction Studies on Amyloid Filaments. *J Histochem Cytochem* *16*, 673-77.
- Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J.T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003). Reconstitution of [gamma]-secretase activity. *Nat Cell Biol* *5*, 486-88.
- Eichner, T., and Radford, S.E. (2011). Understanding the complex mechanisms of β 2-microglobulin amyloid assembly. *FEBS J* *278*, 3868-883.
- Elliot, M.A., Karoonuthaisiri, N., Huang, J., Bibb, M.J., Cohen, S.N., Kao, C.M., and Buttner, M.J. (2003). The chaplins: a family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Genes Dev* *17*, 1727-740.
- Fay, D.S., Fluet, A., Johnson, C.J., and Link, C.D. (1998). In Vivo Aggregation of β -Amyloid Peptide Variants. *J Neurochem* *71*, 1616-625.
- Finelli, A., Kelkar, A., Song, H.J., Yang, H., and Konsolaki, M. (2004). A model for studying Alzheimer's Abeta42-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Neurosci* *26*, 365-375.
- Fleming, L.M., and Johnson, G.V. (1995). Modulation of the phosphorylation state of tau in situ: the roles of calcium and cyclic AMP. *Biochem J* *309* (Pt 1), 41-47.
- Flood, D.G., Lin, Y.G., Lang, D.M., Trusko, S.P., Hirsch, J.D., Savage, M.J., Scott, R.W., and Howland, D.S. (2009). A transgenic rat model of Alzheimer's disease with extracellular Abeta deposition. *Neurobiol Aging* *30*, 1078-090.
- Fonte, V., Kapulkin, W.J., Kapulkin, V., Taft, A., Fluet, A., Friedman, D., and Link, C.D. (2002). Interaction of intracellular beta amyloid peptide with chaperone proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 9439-444.
- Fonte, V., Kipp, D.R., Yerg, J., Merin, D., Forrestal, M., Wagner, E., Roberts, C.M., and Link, C.D. (2008). Suppression of in vivo beta-amyloid peptide toxicity by overexpression of the HSP-16.2 small chaperone protein. *J Biol Chem* *283*, 784-791.
- Fowler, D.M., Koulov, A.V., Alory-Jost, C., Marks, M.S., Balch, W.E., and Kelly, J.W. (2006). Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol* *4*, e6.
- Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D.A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., et al. (2002). aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* *3*, 85-97.
- Gajdusek, D.C., and Zigas, V. (1957). Degenerative Disease of the Central Nervous System in New Guinea. *N Engl J Med* *257*, 974-78.
- Gambetti, P., Kong, Q., Zou, W., Parchi, P., and Chen, S.G. (2003). Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *British Medical Bulletin* *66*, 213-239.

- Gambetti, P., Parchi, P., Petersen, R.B., Chen, S.G., and Lugaresi, E. (1995). Fatal Familial Insomnia and Familial Creutzfeldt-Jakob Disease: Clinical, Pathological and Molecular Features. *Brain Pathology* 5, 43-51.
- Gao, Y., and Pimplikar, S.W. (2001). The gamma -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14979-984.
- Gasparini, L., Racchi, M., Binetti, G., Trabucchi, M., Solerte, S.B., Alkon, D., Etcheberrigaray, R., Gibson, G., Blass, J., et al. (1998). Peripheral markers in testing pathophysiological hypotheses and diagnosing Alzheimer's disease. *FASEB J* 12, 17-34.
- Gauthier, L.R., Charrin, B.C., Borrell-Pagès, M., Dompierre, J.P., Rangone, H., Cordelières, F.P., De Mey, J., MacDonald, M.E., Lessmann, V., et al. (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118, 127-138.
- Gejyo, F., Yamada, T., Odani, S., Nakagawa, Y., Arakawa, M., Kunitomo, T., Kataoka, H., Suzuki, M., Hirasawa, Y., et al. (1985). A new form of amyloid protein associated with chronic hemodialysis was identified as β 2-microglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* 129, 701-06.
- Gellermann, G.P., Byrnes, H., Striebinger, A., Ullrich, K., Mueller, R., Hillen, H., and Barghorn, S. (2008). Abeta-globulomers are formed independently of the fibril pathway. *Neurobiol Dis* 30, 212-220.
- Ghisso, J., Rostagno, A., Gardella, J.E., Liem, L., Gorevic, P.D., and Frangione, B. (1992). A 109-amino-acid C-terminal fragment of Alzheimer's-disease amyloid precursor protein contains a sequence, -RHDS-, that promotes cell adhesion. *Biochem J* 288, 1053-59.
- Glenner, G.G., Ein, D., Eanes, E.D., Bladen, H.A., Terry, W., and Page, D.L. (1971). Creation of "amyloid" fibrils from Bence Jones proteins in vitro. *Science* 174, 712-14.
- Glenner, G.G., Terry, W., Harada, M., Isersky, C., and Page, D. (1971). Amyloid fibril proteins: proof of homology with immunoglobulin light chains by sequence analyses. *Science* 172, 1150-51.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Cairns, N.J., and Crowther, R.A. (1992). Tau proteins of alzheimer paired helical filaments: Abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8, 159-168.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., and Crowther, R.A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3, 519-526.
- Goldberg, Y.P., Nicholson, D.W., Rasper, D.M., Kalchman, M.A., Koide, H.B., Graham, R.K., Bromm, M., Kazemi-Esfarjani, P., Thornberry, N.A., et al. (1996). Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat Genet* 13, 442-49.
- Goldsbury, C., Kistler, J., Aebi, U., Arvinte, T., and Cooper, G.J. (1999). Watching amyloid fibrils grow by time-lapse atomic force microscopy. *J Mol Biol* 285, 33-39.
- Gong, Y., Chang, L., Viola, K.L., Lacor, P.N., Lambert, M.P., Finch, C.E., Krafft, G.A., and Klein, W.L. (2003). Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10417-422.

- Gorevic, P.D., Casey, T.T., Stone, W.J., DiRaimondo, C.R., Prelli, F.C., and Frangione, B. (1985). Beta-2 microglobulin is an amyloidogenic protein in man. *J Clin Invest* 76, 2425-29.
- Gouras, G.K., Tsai, J., Naslund, J., Vincent, B., Edgar, M., Checler, F., Greenfield, J.P., Haroutunian, V., Buxbaum, J.D., et al. (2000). Intraneuronal A β 42 Accumulation in Human Brain. *American Journal of Pathology* 156, 15-20.
- Götz, J., Chen, F., van Dorpe, J., and Nitsch, R.M. (2001). Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by A β 42 fibrils. *Science* 293, 1491-95.
- Greeve, I., Kretschmar, D., Tschäpe, J.A., Beyn, A., Brellinger, C., Schweizer, M., Nitsch, R.M., and Reifegerste, R. (2004). Age-dependent neurodegeneration and Alzheimer-amyloid plaque formation in transgenic *Drosophila*. *J Neurosci* 24, 3899-3906.
- Gregori, L., Fuchs, C., Figueiredo-Pereira, M.E., Van Nostrand, W.E., and Goldgaber, D. (1995). Amyloid beta-protein inhibits ubiquitin-dependent protein degradation in vitro. *J Biol Chem* 270, 19702-08.
- Guillot-Sestier, M.V., and Checler, F. (2012). Cellular prion and its catabolites in the brain: production and function. *Curr Mol Med* 12, 304-315.
- Gustke, N., Trinczek, B., Biernat, J., Mandelkow, E., and Mandelkow, E. (1994). Domains of tau Protein and Interactions with Microtubules. *Biochemistry* 33, 9511-522.
- Gutierrez-Zepeda, A., Santell, R., Wu, Z., Brown, M., Wu, Y., Khan, I., Link, C.D., Zhao, B., and Luo, Y. (2005). Soy isoflavone glycitein protects against beta amyloid-induced toxicity and oxidative stress in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *BMC Neurosci* 6, 54.
- Haass, C., Hung, A.Y., Schlossmacher, M.G., Teplow, D.B., and Selkoe, D.J. (1993). beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem* 268, 3021-24.
- Haass, C., Hung, A.Y., Selkoe, D.J., and Teplow, D.B. (1994). Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. *Journal of Biological Chemistry* 269, 17741-48.
- Haass, C., Lemere, C.A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L., and Selkoe, D.J. (1995). The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by [beta]-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med* 1, 1291-96.
- Haass, C., Schlossmacher, M.G., Hung, A.Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B.L., Lieberburg, I., Koo, E.H., Schenk, D., et al. (1992). Amyloid [beta]-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322-25.
- Hainfellner, J.A., Brantner-Inthaler, S., Cervenáková, L., Brown, P., Kitamoto, T., Tateishi, J., Diringer, H., Liberski, P.P., Regele, H., et al. (1995). The Original Gerstmann-Sträussler-Scheinker Family of Austria: Divergent Clinicopathological Phenotypes but Constant PrP Genotype. *Brain Pathology* 5, 201-211.
- Halfmann, R., Jarosz, D.F., Jones, S.K., Chang, A., Lancaster, A.K., and Lindquist, S. (2012). Prions are a common mechanism for phenotypic inheritance in wild yeasts. *Nature* 482, 363-68.
- Hammar, M., Bian, Z., and Normark, S. (1996). Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 6562-66.

- Hansson Petersen, C.A., Alikhani, N., Behbahani, H., Wiehager, B., Pavlov, P.F., Alafuzoff, I., Leinonen, V., Ito, A., Winblad, B., et al. (2008). The amyloid β -peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 13145-150.
- Harada, J., and Sugimoto, M. (1999). Activation of caspase-3 in beta-amyloid-induced apoptosis of cultured rat cortical neurons. *Brain Research* 842, 311-323.
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M.L., Pahwa, J.S., Moskvina, V., Dowzell, K., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41, 1088-093.
- Harper, J.D., Lieber, C.M., and Lansbury, P.T. (1997). Atomic force microscopic imaging of seeded fibril formation and fibril branching by the Alzheimer's disease amyloid-beta protein. *Chem Biol* 4, 951-59.
- Harrington, S.M., Strauman, M.C., Abe, C.M., and Nataro, J.P. (2005). Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative Escherichia coli. *Cell Microbiol* 7, 1565-578.
- Hartl, F.U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475, 324-332.
- Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lübke, T., Lena Illert, A., et al. (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet* 11, 2615-624.
- Hasegawa, H., Sanjo, N., Chen, F., Gu, Y.-J., Shier, C., Petit, A., Kwarai, T., Katayama, T., Schmidt, S.D., et al. (2004). Both the Sequence and Length of the C Terminus of PEN-2 Are Critical for Intermolecular Interactions and Function of Presenilin Complexes. *Journal of Biological Chemistry* 279, 46455-463.
- Her, L.S., and Goldstein, L.S. (2008). Enhanced sensitivity of striatal neurons to axonal transport defects induced by mutant huntingtin. *J Neurosci* 28, 13662-672.
- Hernandez-Zimbron, L.F., Luna-Muñoz, J., Mena, R., Vazquez-Ramirez, R., Kubli-Garfias, C., Cribbs, D.H., Manoutcharian, K., and Gevorgian, G. (2012). Amyloid- β peptide binds to cytochrome C oxidase subunit 1. *PLoS One* 7, e42344.
- Ho, A., and Südhof, T.C. (2004). Binding of F-spondin to amyloid-beta precursor protein: a candidate amyloid-beta precursor protein ligand that modulates amyloid-beta precursor protein cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2548-553.
- Holmes, D.L., Lancaster, A.K., Lindquist, S., and Halfmann, R. (2013). Heritable remodeling of yeast multicellularity by an environmentally responsive prion. *Cell* 153, 153-165.
- Hope, J., Reekie, L.J.D., Hunter, N., Multhaup, G., Beyreuther, K., White, H., Scott, A.C., Stack, M.J., Dawson, M., and Wells, G.A.H. (1988). Fibrils from brains of cows with new cattle disease contain scrapie-associated protein. *Nature* 336, 390-92.
- Hori, Y., Hashimoto, T., Wakutani, Y., Urakami, K., Nakashima, K., Condron, M.M., Tsubuki, S., Saido, T.C., Teplow, D.B., and Iwatsubo, T. (2007). The Tottori (D7N) and English (H6R) familial Alzheimer disease mutations accelerate A β fibril formation without increasing protofibril formation. *J Biol Chem* 282, 4916-923.

- Hornsten, A., Lieberthal, J., Fadia, S., Malins, R., Ha, L., Xu, X., Daigle, I., Markowitz, M., O'Connor, G., et al. (2007). APL-1, a *Caenorhabditis elegans* protein related to the human beta-amyloid precursor protein, is essential for viability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1971-76.
- Hoshi, M., Nishida, E., Miyata, Y., Sakai, H., Miyoshi, T., Ogawara, H., and Akiyama, T. (1987). Protein kinase C phosphorylates tau and induces its functional alterations. *FEBS Lett* 217, 237-241.
- Hrncic, R., Wall, J., Wolfenbarger, D.A., Murphy, C.L., Schell, M., Weiss, D.T., and Solomon, A. (2000). Antibody-Mediated Resolution of Light Chain-Associated Amyloid Deposits. *Am J Pathol* 157, 1239-246.
- Hu, X., Hicks, C.W., He, W., Wong, P., Macklin, W.B., Trapp, B.D., and Yan, R. (2006). Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci* 9, 1520-25.
- Huse, J.T., Pijak, D.S., Leslie, G.J., Lee, V.M., and Doms, R.W. (2000). Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J Biol Chem* 275, 33729-737.
- Huysseune, S., Kienlen-Campard, P., Hébert, S., Tasiaux, B., Leroy, K., Devuyst, O., Brion, J.P., De Strooper, B., and Octave, J.N. (2009). Epigenetic control of aquaporin 1 expression by the amyloid precursor protein. *FASEB J* 23, 4158-167.
- Ihara, Y., Nukina, N., Miura, R., and Ogawara, M. (1986). Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Biochem* 99, 1807-810.
- Iijima, K., Liu, H.P., Chiang, A.S., Hearn, S.A., Konsolaki, M., and Zhong, Y. (2004). Dissecting the pathological effects of human Abeta40 and Abeta42 in *Drosophila*: a potential model for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6623-28.
- Iijima-Ando, K., Hearn, S.A., Granger, L., Shenton, C., Gatt, A., Chiang, H.C., Hakker, I., Zhong, Y., and Iijima, K. (2008). Overexpression of neprilysin reduces alzheimer amyloid-beta42 (Abeta42)-induced neuron loss and intraneuronal Abeta42 deposits but causes a reduction in cAMP-responsive element-binding protein-mediated transcription, age-dependent axon pathology, and premature death in *Drosophila*. *J Biol Chem* 283, 19066-076.
- Inoue, S. (2008). In situ Abeta pores in AD brain are cylindrical assembly of Abeta protofilaments. *Amyloid* 15, 223-233.
- Jarrett, J.T., and Lansbury, P.T. (1992). Amyloid fibril formation requires a chemically discriminating nucleation event: studies of an amyloidogenic sequence from the bacterial protein OsmB. *Biochemistry* 31, 12345-352.
- Johansson, A.S., Berglind-Dehlin, F., Karlsson, G., Edwards, K., Gellerfors, P., and Lannfelt, L. (2006). Physicochemical characterization of the Alzheimer's disease-related peptides A beta 1-42Arctic and A beta 1-42wt. *FEBS J* 273, 2618-630.
- de Jong, W., Wösten, H.A., Dijkhuizen, L., and Claessen, D. (2009). Attachment of *Streptomyces coelicolor* is mediated by amyloid fimbriae that are anchored to the cell surface via cellulose. *Mol Microbiol* 73, 1128-140.
- De Jonghe, C., Esselens, C., Kumar-Singh, S., Craessaerts, K., Serneels, S., Checler, F., Annaert, W., Van Broeckhoven, C., and De Strooper, B. (2001). Pathogenic APP mutations near the gamma-secretase cleavage site differentially affect Abeta secretion and APP C-terminal fragment stability. *Hum Mol Genet* 10, 1665-671.

- De Jonghe, C., Zehr, C., Yager, D., Prada, C.M., Younkin, S., Hendriks, L., Van Broeckhoven, C., and Eckman, C.B. (1998). Flemish and Dutch mutations in amyloid beta precursor protein have different effects on amyloid beta secretion. *Neurobiol Dis* 5, 281-86.
- Jun, G., Naj, A.C., Beecham, G.W., Wang, L.S., Buross, J., Gallins, P.J., Buxbaum, J.D., Ertekin-Taner, N., Fallin, M.D., et al. (2010). Meta-analysis confirms CR1, CLU, and PICALM as Alzheimer disease risk loci and reveals interactions with APOE genotypes. *Arch Neurol* 67, 1473-484.
- Kato-Negishi, M., Muramoto, K., Kawahara, M., Hosoda, R., Kuroda, Y., and Ichikawa, M. (2003). Bicuculline induces synapse formation on primary cultured accessory olfactory bulb neurons. *Eur J Neurosci* 18, 1343-352.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W., and Glabe, C.G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300, 486-89.
- Kayed, R., Pensalfini, A., Margol, L., Sokolov, Y., Sarsoza, F., Head, E., Hall, J., and Glabe, C. (2009). Annular protofibrils are a structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer. *J Biol Chem* 284, 4230-37.
- Kim, D.Y., Carey, B.W., Wang, H., Ingano, L.A., Binshtok, A.M., Wertz, M.H., Pettingell, W.H., He, P., Lee, V.M., et al. (2007). BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nat Cell Biol* 9, 755-764.
- King, C.-Y., and Diaz-Avalos, R. (2004). Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature* 428, 319-323.
- Koo, E.H., and Squazzo, S.L. (1994). Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem* 269, 17386-89.
- Koo, E.H., Sisodia, S.S., Archer, D.R., Martin, L.J., Weidemann, A., Beyreuther, K., Fischer, P., Masters, C.L., and Price, D.L. (1990). Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1561-65.
- Kotulska, K., Larysz-Brysz, M., LePecheur, M., Marcol, W., Lewin-Kowalik, J., Paly, E., and London, J. (2010). APP overexpression prevents neuropathic pain and motoneuron death after peripheral nerve injury in mice. *Brain Research Bulletin* 81, 378-384.
- Kraepelin, E. (1912). *Psychiatrie : ein Lehrbuch für Studierende und Aerzte* (Bath).
- Kuentzel, S.L., Ali, S.M., Altman, R.A., Greenberg, B.D., and Raub, T.J. (1993). The Alzheimer beta-amyloid protein precursor/protease nexin-I is cleaved by secretase in a trans-Golgi secretory compartment in human neuroglioma cells. *Biochem J* 295, 367-378.
- Kumar, A., Bullard, R.L., Patel, P., Paslay, L.C., Singh, D., Bienkiewicz, E.A., Morgan, S.E., and Rangachari, V. (2011). Non-esterified fatty acids generate distinct low-molecular weight amyloid- β (A β 42) oligomers along pathway different from fibril formation. *PLoS One* 6, e18759.
- Kumar, A., Paslay, L.C., Lyons, D., Morgan, S.E., Correia, J.J., and Rangachari, V. (2012). Specific soluble oligomers of amyloid- β peptide undergo replication and form non-fibrillar aggregates in interfacial environments. *J Biol Chem* 287, 21253-264.

- Lacroute, F. (1971). Non-Mendelian mutation allowing ureidosuccinic acid uptake in yeast. *J Bacteriol* 106, 519-522.
- LaFerla, F.M., Green, K.N., and Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8, 499-509.
- Lagos, R., Wilkens, M., Vergara, C., Cecchi, X., and Monasterio, O. (1993). Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membranes. *FEBS Lett* 321, 145-48.
- Lambert, J.C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M.J., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41, 1094-99.
- Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., et al. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6448-453.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3922-27.
- Lancaster, A.K., Bardill, J.P., True, H.L., and Masel, J. (2010). The spontaneous appearance rate of the yeast prion [PSI⁺] and its implications for the evolution of the evolvability properties of the [PSI⁺] system. *Genetics* 184, 393-400.
- Lashuel, H.A., Hartley, D.M., Petre, B.M., Wall, J.S., Simon, M.N., Walz, T., and Lansbury, P.T. (2003). Mixtures of wild-type and a pathogenic (E22G) form of Abeta40 in vitro accumulate protofibrils, including amyloid pores. *J Mol Biol* 332, 795-808.
- Lauren, J., Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Gilbert, J.W., and Strittmatter, S.M. (2009). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-[bgr] oligomers. *Nature* 457, 1128-132.
- Lee, J.A., Beigneux, A., Ahmad, S.T., Young, S.G., and Gao, F.B. (2007). ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr Biol* 17, 1561-67.
- Lee, V.M., Balin, B.J., Otvos, L., and Trojanowski, J.Q. (1991). A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science* 251, 675-78.
- Lesné, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M., and Ashe, K.H. (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440, 352-57.
- Levitan, D., and Greenwald, I. (1995). Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. *Nature* 377, 351-54.
- Lewis, J., Dickson, D.W., Lin, W.L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S.H., Sahara, N., Skipper, L., et al. (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293, 1487-491.
- Leyssen, M., Ayaz, D., Hébert, S.S., Reeve, S., De Strooper, B., and Hassan, B.A. (2005). Amyloid precursor protein promotes post-developmental neurite arborization in the *Drosophila* brain. *EMBO J* 24, 2944-955.

- Li, H.L., Roch, J.-M., Sundsmo, M., Otero, D., Sisodia, S., Thomas, R., and Saitoh, T. (1997). Defective neurite extension is caused by a mutation in amyloid β /A4 ($A\beta$) protein precursor found in Familial Alzheimer's Disease. *Journal of Neurobiology* 32, 469-480.
- Li, S.H., and Li, X.J. (1998). Aggregation of N-terminal huntingtin is dependent on the length of its glutamine repeats. *Hum Mol Genet* 7, 777-782.
- Li, X., and Greenwald, I. (1997). HOP-1, a *Caenorhabditis elegans* presenilin, appears to be functionally redundant with SEL-12 presenilin and to facilitate LIN-12 and GLP-1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12204-09.
- Lindwall, G., and Cole, R.D. (1984). Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *Journal of Biological Chemistry* 259, 5301-05.
- Link, C.D. (1995). Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 9368-372.
- Link, C.D., Johnson, C.J., Fonte, V., Paupard, M., Hall, D.H., Styren, S., Mathis, C.A., and Klunk, W.E. (2001). Visualization of fibrillar amyloid deposits in living, transgenic *Caenorhabditis elegans* animals using the sensitive amyloid dye, X-34. *Neurobiol Aging* 22, 217-226.
- Link, C.D., Taft, A., Kapulkin, V., Duke, K., Kim, S., Fei, Q., Wood, D.E., and Sahagan, B.G. (2003). Gene expression analysis in a transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model. *Neurobiol Aging* 24, 397-413.
- Liu, L., Orozco, I.J., Planel, E., Wen, Y., Bretteville, A., Krishnamurthy, P., Wang, L., Herman, M., Figueroa, H., et al. (2008). A transgenic rat that develops Alzheimer's disease-like amyloid pathology, deficits in synaptic plasticity and cognitive impairment. *Neurobiol Dis* 31, 46-57.
- Logue, M.W., Schu, M., Vardarajan, B.N., Buross, J., Green, R.C., Go, R.C., Griffith, P., Obisesan, T.O., Shatz, R., et al. (2011). A comprehensive genetic association study of Alzheimer disease in African Americans. *Arch Neurol* 68, 1569-579.
- Loo, D.T., Copani, A., Pike, C.J., Whittemore, E.R., Walencewicz, A.J., and Cotman, C.W. (1993). Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 7951-55.
- de Lorenzo, V., and Pugsley, A.P. (1985). Microcin E492, a low-molecular-weight peptide antibiotic which causes depolarization of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Antimicrob Agents Chemother* 27, 666-69.
- Lourenço, F.C., Galvan, V., Fombonne, J., Corset, V., Llambi, F., Müller, U., Bredesen, D.E., and Mehlen, P. (2009). Netrin-1 interacts with amyloid precursor protein and regulates amyloid-beta production. *Cell Death Differ* 16, 655-663.
- Lovell, M.A., Robertson, J.D., Teesdale, W.J., Campbell, J.L., and Markesbery, W.R. (1998). Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci* 158, 47-52.
- Lund, P.M., and Cox, B.S. (1981). Reversion analysis of [psi-] mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetical research* 37, 173-182.
- Luo, L., Tully, T., and White, K. (1992). Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for *App1* gene. *Neuron* 9, 595-605.
- Lustbader, J.W., Cirilli, M., Lin, C., Xu, H.W., Takuma, K., Wang, N., Caspersen, C., Chen, X., Pollak, S., et al. (2004). A β AD directly links A β to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science* 304, 448-452.

- Lührs, T., Ritter, C., Adrian, M., Riek-Loher, D., Bohrmann, B., Döbeli, H., Schubert, D., and Riek, R. (2005). 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 17342-47.
- Lysek, D.A., Schorn, C., Nivon, L.G., Esteve-Moya, V., Christen, B., Calzolari, L., von Schroetter, C., Fiorito, F., Herrmann, T., et al. (2005). Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 640-45.
- Ma, J., Yee, A., Brewer, H.B., Das, S., and Potter, H. (1994). Amyloid-associated proteins [alpha]1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer [beta]-protein into filaments. *Nature* *372*, 92-94.
- Maeda, S., Sahara, N., Saito, Y., Murayama, M., Yoshiike, Y., Kim, H., Miyasaka, T., Murayama, S., Ikai, A., and Takashima, A. (2007). Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments. *Biochemistry* *46*, 3856-861.
- Mahal, S.P., Baker, C.A., Demczyk, C.A., Smith, E.W., Julius, C., and Weissmann, C. (2007). Prion strain discrimination in cell culture: the cell panel assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 20908-913.
- Mahley, R.W., Innerarity, T.L., Rall, S.C., and Weisgraber, K.H. (1984). Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *Journal of Lipid Research* *25*, 1277-294.
- Maji, S.K., Perrin, M.H., Sawaya, M.R., Jessberger, S., Vadodaria, K., Rissman, R.A., Singru, P.S., Nilsson, K.P., Simon, R., et al. (2009). Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science* *325*, 328-332.
- Manczak, M., Anekonda, T.S., Henson, E., Park, B.S., Quinn, J., and Reddy, P.H. (2006). Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet* *15*, 1437-449.
- Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., de Strooper, B., Hartmann, D., and Saftig, P. (2005). ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 9182-87.
- Mattson, M.P., Cheng, B., Culwell, A.R., Esch, F.S., Lieberburg, I., and Rydel, R.E. (1993). Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* *10*, 243-254.
- Mattson, M.P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I., and Rydel, R.E. (1992). beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci* *12*, 376-389.
- McColl, G., Roberts, B.R., Gunn, A.P., Perez, K.A., Tew, D.J., Masters, C.L., Barnham, K.J., Cherny, R.A., and Bush, A.I. (2009). The *Caenorhabditis elegans* A beta 1-42 model of Alzheimer disease predominantly expresses A beta 3-42. *J Biol Chem* *284*, 22697-2702.
- McCutchen, S.L., Colon, W., and Kelly, J.W. (1993). Transthyretin mutation Leu-55-Pro significantly alters tetramer stability and increases amyloidogenicity. *Biochemistry* *32*, 12119-127.
- McCutchen, S.L., Lai, Z., Miroy, G.J., Kelly, J.W., and Colon, W. (1995). Comparison of Lethal and Nonlethal Transthyretin Variants and Their Relationship to Amyloid Disease. *Biochemistry* *34*, 13527-536.

- McLaurin, J., and Chakrabartty, A. (1996). Membrane disruption by Alzheimer beta-amyloid peptides mediated through specific binding to either phospholipids or gangliosides. Implications for neurotoxicity. *J Biol Chem* 271, 26482-89.
- Meehan, S., Berry, Y., Luisi, B., Dobson, C.M., Carver, J.A., and MacPhee, C.E. (2004). Amyloid Fibril Formation by Lens Crystallin Proteins and Its Implications for Cataract Formation. *Journal of Biological Chemistry* 279, 3413-19.
- Merlini, G., and Bellotti, V. (2003). Molecular Mechanisms of Amyloidosis. *N Engl J Med* 349, 583-596.
- Middendorp, O., Ortler, C., Neumann, U., Paganetti, P., Lüthi, U., and Barberis, A. (2004). Yeast growth selection system for the identification of cell-active inhibitors of beta-secretase. *Biochim Biophys Acta* 1674, 29-39.
- Modarresi, F., Faghihi, M.A., Patel, N.S., Sahagan, B.G., Wahlestedt, C., and Lopez-Toledano, M.A. (2011). Knockdown of BACE1-AS Nonprotein-Coding Transcript Modulates Beta-Amyloid-Related Hippocampal Neurogenesis. *Int J Alzheimers Dis* 2011, 929042.
- Moss, M.L., Jin, S.-C., Milla, M.E., Burkhart, W., Carter, H.L., Chen, W.-J., Clay, W.C., Didsbury, J.R., Hassler, D., et al. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-[alpha]. *Nature* 385, 733-36.
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., and Lannfelt, L. (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of [beta]-amyloid. *Nat Genet* 1, 345-47.
- Murakami, K., Irie, K., Morimoto, A., Ohigashi, H., Shindo, M., Nagao, M., Shimizu, T., and Shirasawa, T. (2002). Synthesis, aggregation, neurotoxicity, and secondary structure of various A beta 1-42 mutants of familial Alzheimer's disease at positions 21-23. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 5-10.
- Nagele, R.G., D'Andrea, M.R., Anderson, W.J., and Wang, H.Y. (2002). Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 110, 199-211.
- Naiki, H., Higuchi, K., Nakakuki, K., and Takeda, T. (1991). Kinetics analysis of amyloid fibril polymerization in vitro. *Laboratory Investigation* 65, 104-110.
- Nalivaeva, N.N., and Turner, A.J. (2013). The amyloid precursor protein: A biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Lett* 587, 2046-054.
- Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E., and Ikeda, K. (1991). Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Research* 541, 163-66.
- Nasir, J., Floresco, S.B., O'Kusky, J.R., Diewert, V.M., Richman, J.M., Zeisler, J., Borowski, A., Marth, J.D., Phillips, A.G., and Hayden, M.R. (1995). Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 81, 811-823.
- Neve, R.L., Harris, P., Kosik, K.S., Kurnit, D.M., and Donlon, T.A. (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res Mol Brain Res* 1, 271-280.

- Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D.D., and Tessier-Lavigne, M. (2009). APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 457, 981-89.
- Nilsberth, C., Westlind-Danielsson, A., Eckman, C.B., Condron, M.M., Axelman, K., Forsell, C., Sten, C., Luthman, J., Teplow, D.B., et al. (2001). The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat Neurosci* 4, 887-893.
- Nilsson, S.F., Rask, L., and Peterson, P.A. (1975). Studies on thyroid hormone-binding proteins. II. Binding of thyroid hormones, retinol-binding protein, and fluorescent probes to prealbumin and effects of thyroxine on prealbumin subunit self association. *Journal of Biological Chemistry* 250, 8554-563.
- Nixon, R.A., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W.H., Peterhoff, C., Cataldo, A., and Cuervo, A.M. (2005). Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 113-122.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., and LaFerla, F.M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409-421.
- Odorizzi, G., Babst, M., and Emr, S.D. (1998). Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell* 95, 847-858.
- Oh, J., Kim, J.G., Jeon, E., Yoo, C.H., Moon, J.S., Rhee, S., and Hwang, I. (2007). Amyloidogenesis of type III-dependent harpins from plant pathogenic bacteria. *J Biol Chem* 282, 13601-09.
- Oh, S., Hong, H.S., Hwang, E., Sim, H.J., Lee, W., Shin, S.J., and Mook-Jung, I. (2005). Amyloid peptide attenuates the proteasome activity in neuronal cells. *Mech Ageing Dev* 126, 1292-99.
- Ohya, Y., Asahara, H., Chui, D.H., Tsuruta, Y., Sakae, N., Miyoshi, K., Yamada, T., Kikuchi, H., Taniwaki, T., et al. (2005). Intracellular Abeta42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *FASEB J* 19, 255-57.
- Olsen, A., Jonsson, A., and Normark, S. (1989). Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on Escherichia coli. *Nature* 338, 652-55.
- Ono, K., Condron, M.M., and Teplow, D.B. (2010). Effects of the English (H6R) and Tottori (D7N) familial Alzheimer disease mutations on amyloid beta-protein assembly and toxicity. *J Biol Chem* 285, 23186-197.
- Outeiro, T.F., Putcha, P., Tetzlaff, J.E., Spoelgen, R., Koker, M., Carvalho, F., Hyman, B.T., and McLean, P.J. (2008). Formation of toxic oligomeric alpha-synuclein species in living cells. *PLoS One* 3, e1867.
- Palladini, G., Lavatelli, F., Russo, P., Perlini, S., Perfetti, V., Bosoni, T., Obici, L., Bradwell, A.R., D'Eril, G.M., et al. (2006). Circulating amyloidogenic free light chains and serum N-terminal natriuretic peptide type B decrease simultaneously in association with improvement of survival in AL. *Blood* 107, 3854-58.
- Pan, D., and Rubin, G.M. (1997). Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during Drosophila and vertebrate neurogenesis. *Cell* 90, 271-280.

- Pardossi-Piquard, R., Petit, A., Kawarai, T., Sunyach, C., Alves da Costa, C., Vincent, B., Ring, S., D'Adamio, L., Shen, J., et al. (2005). Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron* 46, 541-554.
- Parri, R.H., and Dineley, T.K. (2010). Nicotinic acetylcholine receptor interaction with beta-amyloid: molecular, cellular, and physiological consequences. *Curr Alzheimer Res* 7, 27-39.
- Pattison, I.H., and Millson, G.C. (1961). Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J Comp Pathol* 71, 101-09.
- Pepys, M.B., Hawkins, P.N., Booth, D.R., Vigushin, D.M., Tennent, G.A., Soutar, A.K., Totty, N., Nguyen, O., Blake, C.C.F., et al. (1993). Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature* 362, 553-57.
- Pericak-Vance, M.A., Bebout, J.L., Gaskell, P.C., Yamaoka, L.H., Hung, W.Y., Alberts, M.J., Walker, A.P., Bartlett, R.J., Haynes, C.A., and Welsh, K.A. (1991). Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet* 48, 1034-050.
- Pramatarova, A., Chen, K., and Howell, B.W. (2008). A genetic interaction between the APP and Dab1 genes influences brain development. *Mol Cell Neurosci* 37, 178-186.
- Pras, M., Schubert, M., Zucker-Franklin, D., Rimon, A., and Franklin, E.C. (1968). The characterization of soluble amyloid prepared in water. *J Clin Invest* 47, 924-933.
- Prigent, S., and Rezaei, H. (2011). PrP assemblies: Spotting the responsible regions in Prion propagation. *Prion* 5, 69-75.
- Prokop, S., Shirotani, K., Edbauer, D., Haass, C., and Steiner, H. (2004). Requirement of PEN-2 for Stabilization of the Presenilin N-/C-terminal Fragment Heterodimer within the γ -Secretase Complex. *Journal of Biological Chemistry* 279, 23255-261.
- Prusiner, S.B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136-144.
- Prusiner, S.B. (1997). Prion Diseases and the BSE Crisis. *Science* 278, 245-251.
- Qiang, W., Yau, W.M., Luo, Y., Mattson, M.P., and Tycko, R. (2012). Antiparallel β -sheet architecture in Iowa-mutant β -amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*
- Qi-Takahara, Y., Morishima-Kawashima, M., Tanimura, Y., Dolios, G., Hirokuni, N., Horikoshi, Y., Kametani, F., Maeda, M., Saido, T.C., et al. (2005). Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J Neurosci* 25, 436-445.
- Rabe, S., Reichwald, J., Ammaturo, D., de Strooper, B., Saftig, P., Neumann, U., and Staufenbiel, M. (2011). The Swedish APP mutation alters the effect of genetically reduced BACE1 expression on the APP processing. *J Neurochem* 119, 231-39.
- Raiborg, C., and Stenmark, H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458, 445-452.
- Rangachari, V., Reed, D.K., Moore, B.D., and Rosenberry, T.L. (2006). Secondary structure and interfacial aggregation of amyloid-beta(1-40) on sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry* 45, 8639-648.

- Raymond, C.K., Howald-Stevenson, I., Vater, C.A., and Stevens, T.H. (1992). Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell* 3, 1389-1402.
- Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D., and Saftig, P. (2005). ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J* 24, 742-752.
- Rhee, S.K., Quist, A.P., and Lal, R. (1998). Amyloid β Protein-(1-42) Forms Calcium-permeable, Zn^{2+} -sensitive Channel. *Journal of Biological Chemistry* 273, 13379-382.
- Rice, H.C., Townsend, M., Bai, J., Suth, S., Cavanaugh, W., Selkoe, D.J., and Young-Pearse, T.L. (2012). Pancortins interact with amyloid precursor protein and modulate cortical cell migration. *Development* 139, 3986-996.
- Rizet, G. (1952). Les phénomènes de barrage chez *Podospora anserina*. I. Analyse génétique des barrages entre souches S et s. *Rev Cytol Biol Veg* 13, 51-92.
- Rogers, D.R. (1965). Screening for amyloid with the thioflavin-T fluorescent method. *Am J Clin Pathol* 44.
- Rosenthal, C.J., Franklin, E.C., Frangione, B., and Greenspan, J. (1976). Isolation and partial characterization of SAA-an amyloid-related protein from human serum. *J Immunol* 116, 1415-18.
- Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P., and Blobel, C.P. (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol* 164, 769-779.
- Salmon, J.-M., and Barre, P. (1998). Improvement of Nitrogen Assimilation and Fermentation Kinetics under Enological Conditions by Derepression of Alternative Nitrogen-Assimilatory Pathways in an Industrial *Saccharomyces cerevisiae* Strain. *Appl Environ Microbiol* 64, 3831-37.
- Sanan, D.A., Weisgraber, K.H., Russell, S.J., Mahley, R.W., Huang, D., Saunders, A., Schmechel, D., Wisniewski, T., Frangione, B., and Roses, A.D. (1994). Apolipoprotein E associates with beta amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils. Isoform apoE4 associates more efficiently than apoE3. *J Clin Invest* 94, 860-69.
- Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D., and Greenberg, M.E. (1998). Huntingtin Acts in the Nucleus to Induce Apoptosis but Death Does Not Correlate with the Formation of Intranuclear Inclusions. *Cell* 95, 55-66.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., et al. (1996). Secreted amyloid [beta]-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2, 864-870.
- Schmidt, M., Sachse, C., Richter, W., Xu, C., Fändrich, M., and Grigorieff, N. (2009). Comparison of Alzheimer A β (1-40) and A β (1-42) amyloid fibrils reveals similar protofilament structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19813-18.
- Schubert, D., Jin, L.-W., Saitoh, T., and Cole, G. (1989). The regulation of amyloid β protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron* 3, 689-694.
- Schubert, W., Prior, R., Weidemann, A., Dirksen, H., Multhaup, G., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1991). Localization of Alzheimer β A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites. *Brain Research* 563, 184-194.

- Serio, T.R., Cashikar, A.G., Kowal, A.S., Sawicki, G.J., Moslehi, J.J., Serpell, L., Arnsdorf, M.F., and Lindquist, S.L. (2000). Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science* 289, 1317-321.
- Seuring, C., Greenwald, J., Wasmer, C., Wepf, R., Saupe, S.J., Meier, B.H., and Riek, R. (2012). The mechanism of toxicity in HET-S/HET-s prion incompatibility. *PLoS Biol* 10, e1001451.
- Shah, S., Lee, S.F., Tabuchi, K., Hao, Y.H., Yu, C., LaPlant, Q., Ball, H., Dann, C.E., Südhof, T., and Yu, G. (2005). Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* 122, 435-447.
- Sian, A.K., Frears, E.R., El-Agnaf, O.M., Patel, B.P., Manca, M.F., Siligardi, G., Hussain, R., and Austen, B.M. (2000). Oligomerization of beta-amyloid of the Alzheimer's and the Dutch-cerebral-haemorrhage types. *Biochem J* 349, 299-308.
- Sipe, J.D., and Cohen, A.S. (2000). Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol* 130, 88-98.
- Sipe, J.D., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Ikeda, S., Merlini, G., Saraiva, M.J., and Westermarck, P. (2010). Amyloid fibril protein nomenclature: 2010 recommendations from the nomenclature committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid* 17, 101-04.
- Smith, J.V., and Luo, Y. (2003). Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by Ginkgo biloba extract EGb 761. *J Alzheimers Dis* 5, 287-300.
- Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Lower, A., Langer, A., Merdes, G., et al. (2005). Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J* 24, 3624-634.
- Solomon, J.P., Page, L.J., Balch, W.E., and Kelly, J.W. (2012). Gelsolin amyloidosis: genetics, biochemistry, pathology and possible strategies for therapeutic intervention. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 47, 282-296.
- Sorci-Thomas, M.G., and Thomas, M.J. (2002). The Effects of Altered Apolipoprotein A-I Structure on Plasma HDL Concentration. *Trends in Cardiovascular Medicine* 12, 121-28.
- Sparrer, H.E., Santoso, A., Szoka, F.C., and Weissman, J.S. (2000). Evidence for the Prion Hypothesis: Induction of the Yeast [PSI⁺] Factor by in Vitro- Converted Sup35 Protein. *Science* 289, 595-99.
- Sparvero, L.J., Patz, S., Brodsky, J.L., and Coughlan, C.M. (2007). Proteomic analysis of the amyloid precursor protein fragment C99: expression in yeast. *Anal Biochem* 370, 162-170.
- Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M., and Goedert, M. (1998). α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 6469-473.
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997). [alpha]-Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839-840.

- Stefan, C.P., Zhang, N., Sokabe, T., Rivetta, A., Slayman, C.L., Montell, C., and Cunningham, K.W. (2013). Activation of an essential calcium signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae* by Kch1 and Kch2, putative low-affinity potassium transporters. *Eukaryot Cell* 12, 204-214.
- Steiner, H., Fluhrer, R., and Haass, C. (2008). Intramembrane Proteolysis by γ -Secretase. *Journal of Biological Chemistry* 283, 29627-631.
- Streltsov, V.A., Varghese, J.N., Masters, C.L., and Nuttall, S.D. (2011). Crystal structure of the amyloid- β p3 fragment provides a model for oligomer formation in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31, 1419-426.
- Struhl, G., and Adachi, A. (2000). Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol Cell* 6, 625-636.
- Sunde, M., Serpell, L.C., Bartlam, M., Fraser, P.E., Pepys, M.B., and Blake, C.C. (1997). Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol* 273, 729-739.
- Takahashi, R.H., Milner, T.A., Li, F., Nam, E.E., Edgar, M.A., Yamaguchi, H., Beal, M.F., Xu, H., Greengard, P., and Gouras, G.K. (2002). Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *Am J Pathol* 161, 1869-879.
- Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G., and Iwatsubo, T. (2003). The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* 422, 438-441.
- Tanaka, M., Chien, P., Naber, N., Cooke, R., and Weissman, J.S. (2004). Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature* 428, 323-28.
- Telling, G.C., Parchi, P., DeArmond, S.J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P., and Prusiner, S.B. (1996). Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* 274, 2079-082.
- Tesco, G., Koh, Y.H., Kang, E.L., Cameron, A.N., Das, S., Sena-Esteves, M., Hiltunen, M., Yang, S.H., Zhong, Z., et al. (2007). Depletion of GGA3 stabilizes BACE and enhances beta-secretase activity. *Neuron* 54, 721-737.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group, . . (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. . *Cell* 72, 971-983.
- Tillement, L., Lecanu, L., and Papadopoulos, V. (2011). Further Evidence on Mitochondrial Targeting of β -Amyloid and Specificity of β -Amyloid-Induced Mitotoxicity in Neurons. *Neurodegener Dis*
- Tong, A.H.Y., and Boone, C. (2006). Synthetic Genetic Array (SGA) Analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. In *Methods in Molecular Biology Yeast Protocols: Second Edition* (
- Tong, A.H.Y., Boone, C., and Stark, I.S.A.M.J. (2007). High-Throughput Strain Construction and Systematic Synthetic Lethal Screening in. In *Methods in Microbiology Yeast Gene Analysis Second Edition* (Academic Press).

- Treusch, S., Hamamichi, S., Goodman, J.L., Matlack, K.E., Chung, C.Y., Baru, V., Shulman, J.M., Parrado, A., Bevis, B.J., et al. (2011). Functional Links Between A β Toxicity, Endocytic Trafficking, and Alzheimer's Disease Risk Factors in Yeast. *Science* 334, 1241-45.
- Turcq, B., Deleu, C., Denayrolles, M., and Bégueret, J. (1991). Two allelic genes responsible for vegetative incompatibility in the fungus *Podospira anserina* are not essential for cell viability. *Molec Gen Genet* 228, 265-269-.
- Tyedmers, J., Madariaga, M.L., and Lindquist, S. (2008). Prion switching in response to environmental stress. *PLoS Biol* 6, e294.
- Uhlich, G.A., Cooke, P.H., and Solomon, E.B. (2006). Analyses of the red-dry-rough phenotype of an *Escherichia coli* O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. *Appl Environ Microbiol* 72, 2564-572.
- Vandebroek, T., Vanhelmont, T., Terwel, D., Borghgraef, P., Lemaire, K., Snauwaert, J., Wera, S., Van Leuven, F., and Winderickx, J. (2005). Identification and Isolation of a Hyperphosphorylated, Conformationally Changed Intermediate of Human Protein Tau Expressed in Yeast†. *Biochemistry* 44, 11466-475.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., et al. (1999). β -Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE. *Science* 286, 735-741.
- Verghese, P.B., Castellano, J.M., Garai, K., Wang, Y., Jiang, H., Shah, A., Bu, G., Frieden, C., and Holtzman, D.M. (2013). ApoE influences amyloid- β (A β) clearance despite minimal apoE/A β association in physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E1807-816.
- Vidal, O., Longin, R., Prigent-Combaret, C., Dorel, C., Hooreman, M., and Lejeune, P. (1998). Isolation of an *Escherichia coli* K-12 Mutant Strain Able To Form Biofilms on Inert Surfaces: Involvement of a New ompR Allele That Increases Curli Expression. *J Bacteriol* 180, 2442-49.
- Wang, X., Perry, G., Smith, M.A., and Zhu, X. (2010). Amyloid-beta-derived diffusible ligands cause impaired axonal transport of mitochondria in neurons. *Neurodegener Dis* 7, 56-59.
- Weidemann, A., Paliga, K., Dürrwang, U., Czech, C., Evin, G., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1997). Formation of stable complexes between two Alzheimer's disease gene products: presenilin-2 and beta-amyloid precursor protein. *Nat Med* 3, 328-332.
- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1858-862.
- Weinreb, P.H., Zhen, W., Poon, A.W., Conway, K.A., and Lansbury, P.T. (1996). NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* 35, 13709-715.
- Wertkin, A.M., Turner, R.S., Pleasure, S.J., Golde, T.E., Younkin, S.G., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1993). Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 9513-17.
- Wickner, R.B. (1994). [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 264, 566-69.

- Will, R., and Zeidler, M. (1996). Diagnosing Creutzfeldt-Jakob disease. *BMJ* 313
- Willem, M., Garratt, A.N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., and Haass, C. (2006). Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314, 664-66.
- Wirths, O., Multhaup, G., Czech, C., Blanchard, V., Moussaoui, S., Tremp, G., Pradier, L., Beyreuther, K., and Bayer, T.A. (2001). Intraneuronal Abeta accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci Lett* 306, 116-120.
- Wisniewski, T., Castaño, E.M., Golabek, A., Vogel, T., and Frangione, B. (1994). Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *Am J Pathol* 145, 1030-35.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., and Selkoe, D.J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and [gamma]-secretase activity. *Nature* 398, 513-17.
- Wong, H.K., Sakurai, T., Oyama, F., Kaneko, K., Wada, K., Miyazaki, H., Kurosawa, M., De Strooper, B., Saftig, P., and Nukina, N. (2005). beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *J Biol Chem* 280, 23009-017.
- Wood, J.G., Mirra, S.S., Pollock, N.J., and Binder, L.I. (1986). Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4040-43.
- Wu, Y., Wu, Z., Butko, P., Christen, Y., Lambert, M.P., Klein, W.L., Link, C.D., and Luo, Y. (2006). Amyloid-beta-induced pathological behaviors are suppressed by Ginkgo biloba extract EGb 761 and ginkgolides in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 26, 13102-113.
- Xia, W., Zhang, J., Perez, R., Koo, E.H., and Selkoe, D.J. (1997). Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: implications for the pathogenesis of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8208-213.
- Xu, X., Zhou, H., and Boyer, T.G. (2011). Mediator is a transducer of amyloid-precursor-protein-dependent nuclear signalling. *EMBO Rep* 12, 216-222.
- Yatin, S.M., Varadarajan, S., Link, C.D., and Butterfield, D.A. (1999). Discussion. *Neurobiol Aging* 20, 325-330.
- Young-Pearse, T.L., Bai, J., Chang, R., Zheng, J.B., LoTurco, J.J., and Selkoe, D.J. (2007). A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *J Neurosci* 27, 14459-469.
- Yu, W.H., Cuervo, A.M., Kumar, A., Peterhoff, C.M., Schmidt, S.D., Lee, J.H., Mohan, P.S., Mercken, M., Farmery, M.R., et al. (2005). Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 171, 87-98.
- Zhang, H., Komano, H., Fuller, R.S., Gandy, S.E., and Frail, D.E. (1994). Proteolytic processing and secretion of human beta-amyloid precursor protein in yeast. Evidence for a yeast secretase activity. *J Biol Chem* 269, 27799-7802.
- Zhang, W., Espinoza, D., Hines, V., Innis, M., Mehta, P., and Miller, D.L. (1997). Characterization of beta-amyloid peptide precursor processing by the yeast Yap3 and Mkc7 proteases. *Biochim Biophys Acta* 1359, 110-122.

Zhou, L., Brouwers, N., Benilova, I., Vandersteen, A., Mercken, M., Van Laere, K., Van Damme, P., Demedts, D., Van Leuven, F., et al. (2011). Amyloid precursor protein mutation E682K at the alternative β -secretase cleavage β' -site increases A β generation. *EMBO Mol Med* 3, 291-302.